



**Développements précliniques de nouveaux outils
utilisant les ultrasons transcraniens guidés par IRM
haut champ pour la délivrance de médicaments dans le
cerveau et la stimulation non invasive de circuits
neuronaux**

Remi Magnin

► **To cite this version:**

Remi Magnin. Développements précliniques de nouveaux outils utilisant les ultrasons transcraniens guidés par IRM haut champ pour la délivrance de médicaments dans le cerveau et la stimulation non invasive de circuits neuronaux. Imagerie. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS037 . tel-01277073

HAL Id: tel-01277073

<https://theses.hal.science/tel-01277073>

Submitted on 22 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS037

**THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
“L'UNIVERSITE PARIS SUD”**

**Ecole Doctorale n°575
Physique et ingénierie: électrons, photons, sciences du vivant
(EOBE)**

Spécialité de Doctorat : Imagerie et Physique Médicale

Par

M. Rémi Magnin

Développements précliniques de nouveaux outils utilisant les ultrasons transcrâniens guidés par IRM haut champ pour la délivrance de médicaments dans le cerveau et la stimulation non invasive de circuits neuronaux

Thèse présentée et soutenue à Neurospin, le 7 janvier 2016:

Composition du Jury :

M. Quesson Bruno, Directeur de Recherche, CNRS, Rapporteur
M. Bouakaz Ayache, Directeur de Recherche, INSERM, Rapporteur
M. Berger François, Directeur de Recherche, INSERM, Examineur
M. Darrasse Luc, Directeur de Recherche, CNRS, Examineur, Président du jury
M. Larrat Benoit, Chercheur, CEA, Encadrant de thèse
M. Dumont Erik, Directeur, Image Guided Therapy, Encadrant de thèse
M. Le Bihan Denis, Directeur de Neurospin, CEA, Directeur de Thèse

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit fait suite à trois années passées au sein de Neurospin, et n'aurait pas été possible sans l'aide de nombreuses personnes que je souhaite remercier ici.

Je souhaite dans un premier temps remercier Denis Le Bihan pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et m'avoir laissé une grande liberté dans mon travail, tout en me faisant profiter de ses conseils.

Je souhaite adresser mes plus chaleureux remerciements à Benoit Larrat, pour m'avoir encadré depuis bientôt quatre ans. Je le remercie de m'avoir accordé sa confiance durant toutes ces années, et de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Ses connaissances et la qualité de sa démarche scientifique m'ont été d'une aide précieuse, et me seront utiles j'en suis sûr pour la suite. Je le remercie également de m'avoir laissé une certaine autonomie, tout en étant présent pour me guider lorsque j'en avais besoin. Je le remercie aussi de sa bonne humeur, de sa gentillesse et de son optimisme, qui m'ont permis de grandement apprécier ces quatre ans et de tenir le coup dans les moments plus difficiles. Je le remercie enfin pour les bons moments passés, notamment au cours des différents congrès scientifiques.

Je souhaite également remercier vivement Erik Dumont, pour m'avoir fait confiance et accepté de financer une partie de ma thèse. Je le remercie pour sa gentillesse, la qualité des discussions scientifiques, et non-scientifiques, que nous avons pu avoir. Je le remercie également pour m'avoir fait découvrir le monde de l'industrie et m'avoir impliqué dans ses projets. Je le remercie enfin pour les bons moments passés ensemble, notamment lors de nos visites dans les laboratoires américains. J'en profite également pour remercier l'ensemble de l'équipe de la société Image Guided Therapy pour notre collaboration, et en particulier Fabien Rabusseau, Frédéric Salabartan et Stéphanie Recco pour leur aide.

J'aimerais évidemment remercier MM. Bruno Quesson et Ayache Bouakaz pour avoir accepté de prendre de leur temps pour rapporter mon travail de thèse. Merci également à MM. François Berger et Luc Darrasse pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Je suis honoré d'avoir pu défendre mon travail devant des chercheurs reconnus et de domaines très variés.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler ou qui ont pu m'aider à Neurospin. En particulier Sébastien Mériaux pour nos discussions, ses idées et ses corrections, ainsi que son aide très précieuse en informatique et sa disponibilité. Françoise Geffroy pour tout son travail et ses magnifiques images, ainsi que sa gentillesse. Michel Luong pour ses connaissances et son aide sur les antennes. Je remercie également Allegra pour tout le travail que nous avons pu effectuer ensemble, mais également pour sa bonne humeur, son enseignement de l'italien et ses recettes. Je remercie également Matthieu, le padawan, pour son aide et son travail durant ces six mois de stage, ainsi que Benjamin. Mes remerciements vont également à Erwan Selingue pour son aide précieuse, ainsi que pour sa gentillesse et ses blagues.

Ce travail est également le fruit de collaborations, et je souhaiterais remercier Valéry Ozenne et Pierre Bour de l'IHU Lyric, ainsi que Matthieu Dreyfus et Adrien Mombrun de Clinattec. Je souhaite également remercier François Lux, et Olivier Tillement de l'Institut Lumière Matière.

Je souhaite également remercier mes voisins de bureau, compagnons de repas et amis : Marianne, pour nos discussions gastronomiques (entre autres) et pour sa compagnie dans les (longs) trajets en RER, Victor pour nos pauses cafés, et les discussions montagne et lièvre à la royale, mais aussi David, Alfredo, Guillaume, Gabrielle, Elodie, Ricardo, Ashley et Pavel.

Je souhaiterais enfin remercier mes proches. Mes amis d'abord, pour tous les bons moments passés et à venir qui m'ont souvent permis de tenir le coup. Un très grand remerciement à ma famille, qui m'a toujours soutenu, et en particulier mes parents qui m'ont fait confiance et m'ont permis de poursuivre mes études et sans qui je n'aurais pas pu arriver jusqu'ici. Et bien sûr un immense merci à Bénédicte, pour sa présence et son soutien de tous les jours depuis maintenant plusieurs années.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| CHAPITRE I. CONTEXTE ET METHODES | 3 |
| I-1. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE | 3 |
| I-1.1. Le rôle de la BHE..... | 3 |
| I-1.2. Structure de la BHE : l'importance des jonctions serrées | 4 |
| I-1.3. Transport de molécules à travers la BHE..... | 5 |
| I-2. DELIVRANCE DE MEDICAMENTS AU CERVEAU : DIFFERENTES METHODES DE PASSAGE DE LA BHE | 6 |
| I-2.1. Injection intracrânienne | 7 |
| I-2.2. Ingénierie moléculaire et façonnage biochimique | 7 |
| I-2.3. Perméabilisation artificielle transitoire de la BHE par voie chimique | 8 |
| I-3. PERMEABILISATION TRANSITOIRE DE LA BHE PAR ULTRASONS FOCALISES | 9 |
| I-3.1. Les mécanismes impliqués | 10 |
| I-3.2. Influence des bulles et des paramètres acoustiques sur la perméabilisation de la BHE | 11 |
| I-4. L'IRM COMME OUTIL DE MONITORING DE LA PERMEABILISATION DE LA BHE | 14 |
| I-4.1. Bref historique de l'IRM..... | 14 |
| I-4.2. Rappels généraux sur l'IRM..... | 15 |
| I-4.3. Imagerie anatomique pour contrôler l'intégrité des tissus | 17 |
| I-4.4. Voir les ultrasons par IRM : l'imagerie de la phase | 19 |
| I-4.5. Mise en évidence et quantification de la perméabilisation : utilisation des agents de contraste IRM | 24 |
| I-5. CONCLUSION | 31 |
| CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME MOTORISE D'ULTRASONS FOCALISES TRANSCRANIENS GUIDES PAR IRM POUR LE RONGEUR | 33 |
| II-1. ENJEUX, CONTRAINTES ET CAHIER DES CHARGES | 33 |
| II-2. PRESENTATION DE LA MOTORISATION | 37 |
| II-3. DEVELOPPEMENT D'UN LIT INTERCHANGEABLE | 40 |
| II-4. DEVELOPPEMENT D'UNE ANTENNE RADIOFREQUENCE ADAPTEE | 42 |
| II-4.1. Double boucles horizontales alimentées en parallèle | 42 |
| II-4.2. Doubles boucles verticales alimentées en parallèle | 44 |
| II-4.3. Antenne simple boucle | 46 |
| II-5. LES TRANSDUCTEURS | 48 |
| II-5.1. Quelques rappels utiles | 49 |
| II-5.2. Simulations et Calibrations..... | 50 |
| II-5.3. Adapter le transducteur à son utilisation..... | 51 |
| II-6. CARACTERISATION DU FACTEUR DE TRANSMISSION DE CRANE DE RATS | 55 |
| II-6.1. Facteur de transmission du crâne en fonction du poids de l'animal | 55 |
| II-6.2. Cartographie du facteur de pression d'un crâne de rat | 57 |
| II-7. PERSPECTIVES | 59 |
| II-7.1. Améliorations techniques envisagées | 59 |
| II-7.2. Cartographie du facteur de transmission d'un crâne de rat par imagerie ARFI..... | 61 |
| II-8. CONCLUSION | 61 |
| CHAPITRE III. DEVELOPPEMENT D'OUTILS LOGICIELS POUR GUIDER LES ULTRASONS..... | 63 |
| III-1. TRANSMISSION D'IMAGES EN TEMPS REEL..... | 63 |
| III-1.1. Bref rappel sur le protocole TCP/IP | 64 |

Table des matières

| | |
|---|------------|
| III-1.2. Utilisation des sockets pour la création d'un environnement client/serveur | 64 |
| III-1.3. Mise en place de la transmission d'images en temps réel | 65 |
| III-2. DEVELOPPEMENT D'UN PROGRAMME POUR LE REPOSITIONNEMENT AUTOMATIQUE DU TRANSDUCTEUR | 68 |
| III-3. DETECTION AUTOMATIQUE DE LA TACHE FOCAL SUR LES IMAGES ARFI | 70 |
| III-3.1. Enjeux et contraintes..... | 70 |
| III-3.2. Masquage robuste du cerveau..... | 71 |
| III-3.3. Solution envisagées pour la détection automatique de la tache focale..... | 75 |
| III-4. PERSPECTIVES | 80 |
| III-5. CONCLUSION | 82 |
| CHAPITRE IV. UTILISATION DU SYSTEME MOTORISE IN VIVO..... | 83 |
| IV-1. PROTOCOLE DE PERMEABILISATION DE LA BHE..... | 83 |
| IV-1.1. Protocole général..... | 83 |
| IV-1.2. Protocole sous IRM | 84 |
| IV-2. VALIDATION DE LA MOTORISATION IN VIVO | 85 |
| IV-2.1. Précision et reproductibilité | 86 |
| IV-2.2. Perméabilisation étendue de la BHE selon des trajectoires arbitraires | 87 |
| IV-3. ETUDE DE L'INFLUENCE DES PARAMETRES ACOUSTIQUES LORS D'UNE PERMEABILISATION DE LA BHE SELON DES TRAJECTOIRES ARBITRAIRES | 88 |
| IV-3.1. Influence de la pression acoustique sur la perméabilisation de la BHE | 88 |
| IV-3.2. Influence du duty cycle sur la perméabilisation de la BHE | 91 |
| IV-3.3. Vérification de l'élévation de température induite lors d'une perméabilisation selon une trajectoire arbitraire..... | 93 |
| IV-3.4. Résultats | 93 |
| IV-4. PERMEABILISATION ETENDUE DE LA BHE..... | 95 |
| IV-5. PERSPECTIVES | 98 |
| IV-5.1. Premières expériences de neuromodulation..... | 98 |
| IV-6. CONCLUSION | 102 |
| CHAPITRE V. ETUDE DES EFFETS DE LA PERMEABILISATION DE LA BHE PAR ULTRASONS ET AMELIORATION DE SA SECURITE..... | 103 |
| V-1. ETUDE HISTOLOGIQUE DES EFFETS A COURT ET MOYEN TERME D'UNE PERMEABILISATION TRANSITOIRE DE LA BHE PAR ULTRASONS..... | 103 |
| V-1.1. Etat de l'art et motivations | 103 |
| V-1.2. Matériel et méthodes..... | 107 |
| V-1.3. Résultats | 108 |
| V-2. ETUDE DU PASSAGE DE PROTEINES DU CERVEAU VERS LE SANG..... | 112 |
| V-2.1. Motivations..... | 112 |
| V-2.2. Choix et induction du modèle animal..... | 113 |
| V-2.3. Protocole expérimental..... | 115 |
| V-3. PERSPECTIVES : SPECTROSCOPIE PAR IRM SUITE A UNE PERMEABILISATION DE LA BHE..... | 120 |
| V-3.1. Rappels utiles sur la spectroscopie par IRM..... | 120 |
| V-3.2. Matériel et méthodes..... | 121 |
| V-3.3. Résultats | 121 |
| V-4. CONCLUSION | 123 |
| CHAPITRE VI. ETUDE DE LA DIFFUSION D'AGENTS DE CONTRASTE DANS LES TISSUS CEREBRAUX SUITE A UNE PERMEABILISATION DE LA BHE..... | 125 |
| VI-1. CONTEXTE ET MOTIVATIONS | 125 |
| VI-1.1. Processus de diffusion dans le milieu extracellulaire des tissus cérébraux | 125 |

| | |
|--|------------|
| VI-1.2. Méthodes de mesure du coefficient de diffusion apparent..... | 126 |
| VI-1.3. Motivations..... | 128 |
| VI-2. MESURES DE RELAXIVITE DES AGENTS DE CONTRASTE..... | 128 |
| VI-2.1. Les agents de contraste utilisés..... | 128 |
| VI-2.2. Protocole expérimental..... | 128 |
| VI-3. MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION LIBRE..... | 129 |
| VI-3.1. Protocole expérimental..... | 129 |
| VI-3.2. Calcul du coefficient de diffusion..... | 130 |
| VI-3.3. Résultats..... | 131 |
| VI-3.4. Mesure des diamètres hydrodynamiques..... | 132 |
| VI-4. MESURES DU COEFFICIENT DE DIFFUSION APPARENT..... | 133 |
| VI-4.1. Protocole expérimental..... | 133 |
| VI-4.2. Résultats..... | 133 |
| VI-5. PERSPECTIVES..... | 135 |
| VI-5.1. Diminution du temps d'acquisition des cartes paramétriques T_1 | 135 |
| VI-5.2. Perméabilisation de la BHT..... | 136 |
| VI-6. CONCLUSION..... | 137 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... | 139 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 141 |
| ANNEXE A : ALGORITHME D'OTSU..... | 153 |
| ANNEXE B : PROTOCOLE UTILISE POUR L'HISTOLOGIE..... | 154 |
| COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES..... | 156 |

Introduction générale

Le vingtième siècle a été le terrain de nombreuses avancées médicales. Sur le plan de la compréhension des mécanismes pathologiques et de leur diagnostic d'une part, grâce notamment à l'émergence des techniques d'imagerie médicale qui ont rendu possible l'observation de l'intérieur d'un organisme vivant de façon non destructive et peu ou pas invasive. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) joue un rôle croissant dans ce secteur. Sur le plan des traitements d'autre part, avec le développement de nombreuses molécules thérapeutiques et l'apparition de nouvelles technologies interventionnelles, telles que la radiothérapie. La radiologie interventionnelle est la combinaison des techniques chirurgicales avec le guidage par une modalité d'imagerie. Ce domaine est en plein essor aujourd'hui. Dans ce domaine, les ultrasons focalisés, notamment guidés par l'imagerie par résonance magnétique, ont émergé plus récemment comme une technologie mature présentant de nombreux avantages par rapport à l'existant : caractères non ionisant et non invasif, variété des effets biologiques obtenus, coût raisonnable.

Grâce aux efforts conjoints des acteurs de santé et de recherche, la médecine est en progrès constant. Un des résultats les plus visibles de ces avancées est l'augmentation de l'espérance de vie constatée au siècle dernier. Ce vieillissement de la population a fait émerger de nouveaux enjeux de santé publique, et on assiste notamment aujourd'hui à une augmentation du nombre de patients atteints de pathologies cérébrales, en particulier des maladies neurodégénératives. Si l'on prend l'exemple de la maladie d'Alzheimer, une expertise effectuée par l'Inserm en 2007 estimait que 850 000 personnes étaient atteintes au sein de la population française, avec l'apparition d'un peu plus de 200 000 cas chaque année. Bien que la compréhension et le diagnostic des maladies affectant le Système Nerveux Central (SNC) aient bénéficié des avancées médicales, très peu de traitements sont aujourd'hui disponibles pour ces pathologies en raison d'un obstacle majeur : la Barrière Hémato-Encéphalique. Cette interface très imperméable, régulant les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral, empêche l'accès de la majorité des molécules thérapeutiques au cerveau.

L'enjeu de cette thèse est de développer de nouveaux outils permettant de réaliser des expériences d'ultrasons focalisés transcrâniens guidés par IRM haut champ chez le rongeur, visant principalement deux applications : la perméabilisation transitoire de la BHE par ultrasons afin de pouvoir délivrer des molécules au SNC, et la neurostimulation. Le développement de ces outils se veut néanmoins plus général, permettant d'envisager d'autres applications des ultrasons focalisés, notamment leur effet thermique.

Ce manuscrit est divisé en 6 chapitres.

Dans le premier chapitre, je fais un rappel général sur le contexte de cette thèse ainsi que sur les méthodes employées. Je présente l'organisation et le rôle de la BHE, puis les techniques envisagées pour la franchir, en décrivant plus précisément l'utilisation des ultrasons. Enfin je rappelle les bases de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), et présente des méthodes d'IRM permettant de planifier et de contrôler le protocole de perméabilisation de la BHE par ultrasons, en particulier en utilisant l'imagerie de la phase pour voir les ultrasons et la relaxométrie T_1 suite à l'injection d'agents de contraste IRM.

Introduction générale

Le deuxième chapitre traite du développement d'un système d'ultrasons focalisés motorisé compatible IRM. Je rappelle les motivations de ce développement, puis les challenges que représente l'intégration d'un tel système dans un IRM préclinique. Les principaux développements techniques réalisés sont ensuite détaillés.

Dans le troisième chapitre, je présente différents outils logiciels développés afin de faciliter et d'automatiser la procédure de perméabilisation de la BHE et le contrôle du système motorisé. J'introduis notamment un outil de transmission et de reconstruction d'images IRM en temps réel, puis un plugin permettant de choisir la région à perméabiliser sur une image anatomique via un rétrocontrôle sur le mouvement des moteurs.

Dans le quatrième chapitre, je présente plusieurs études effectuées avec le système motorisé développé, cherchant à mettre en évidence l'effet des paramètres acoustiques sur l'efficacité de la perméabilisation de la BHE. Ces travaux ont pour but de valider le système, et d'optimiser un protocole de perméabilisation étendue de la BHE.

Un cinquième chapitre traite des effets biologiques de la perméabilisation de la BHE par ultrasons. Les effets induits à court et moyen terme sur les tissus cérébraux sont étudiés grâce à des marquages immunohistochimiques d'animaux dont la BHE a été perméabilisée. Enfin nous cherchons à observer le passage de marqueurs biologiques de tumeurs cérébrales dans le compartiment vasculaire suite à une perméabilisation transitoire de la BHE.

Dans le chapitre six, je présente la diffusion de différents agents de contraste dans les tissus cérébraux suite à une perméabilisation localisée de la BHE. Les résultats obtenus sont comparés avec la diffusion libre de ces mêmes agents ce qui permet de calculer un paramètre appelé tortuosité des tissus cérébraux.

I. Contexte et méthodes

L'objectif de ce chapitre est d'introduire le contexte des travaux effectués durant cette thèse, ainsi que de présenter les méthodes générales utilisées pour conduire ces travaux.

Dans un premier temps, nous rappelons la structure et le rôle de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et voyons en quoi elle est un frein au développement de nouvelles thérapies pour les pathologies cérébrales. Nous présentons ensuite différentes façons permettant de la franchir, et en quoi l'utilisation des ultrasons présente des avantages. Enfin, nous faisons quelques rappels sur les bases de l'IRM, et montrons en quoi il constitue un outil de choix pour le guidage des thérapies par ultrasons. Les principales séquences utilisées durant cette thèse sont introduites.

I-1. La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique est située à l'interface entre le système sanguin et le système nerveux central (SNC). Constituée par les jonctions serrées entre les cellules endothéliales des parois des capillaires cérébraux (Risau & Wolburg 1990), elle protège le SNC des pathogènes circulants mais elle limite aussi le passage paracellulaire de molécules du sang vers le SNC (figure I-1), et régule le passage transcellulaire. La majorité du trafic moléculaire restant (métabolites, ...) s'effectue par des voies transcellulaires. De fait, elle représente un frein pour la délivrance au SNC d'agents thérapeutiques de poids moléculaire important.

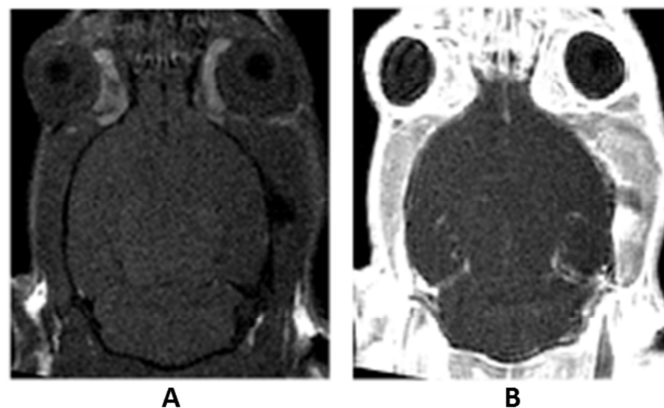


Figure I-1 : Images pondérées T_1 obtenues avant (A) et après (B) injection d'un agent de contraste paramagnétique (Marty 2012). On n'observe pas de modification de signal du cerveau après injection, ce qui signifie que l'agent de contraste n'a pas diffusé dans les tissus cérébraux, contrairement aux tissus environnants présentant un hypersignal.

I-1.1. Le rôle de la BHE

La BHE est impliquée dans de nombreuses fonctions, en particulier de régulation et d'homéostasie. Elle assure le maintien d'une concentration ionique optimale pour un bon fonctionnement neuronal par le biais de canaux et transporteurs ioniques spécifiques, et protège notamment le SNC des variations de la concentration ionique plasmatique qui peuvent survenir par

exemple à la suite d'un effort physique (Hansen 1985; Bradbury et al. 1963), garantissant une signalisation synaptique optimale. De même, elle régule la concentration en neurotransmetteurs, en particulier le glutamate qui peut avoir des effets neurotoxiques, et dont la concentration sanguine peut fortement fluctuer après une prise de nourriture (Abbott et al. 2010). Cette régulation des neurotransmetteurs assure également la séparation entre le SNC et le système nerveux périphérique (SNP), évitant ainsi les phénomènes d'intercommunication (Abbott et al. 2006).

Elle possède aussi un rôle dans l'apport de nutriments essentiels au fonctionnement cérébral, ainsi que dans l'élimination des déchets du métabolisme. Enfin, elle empêche le passage vers le SNC de neurotoxines circulant dans le sang, que ce soit des métabolites ou des macromolécules endogènes telles que certaines protéines pouvant entraîner une neuroinflammation (Nadal et al. 1995; Gingrich & Traynelis 2000), ou encore des agents pathogènes exogènes.

I-1.2. Structure de la BHE : l'importance des jonctions serrées

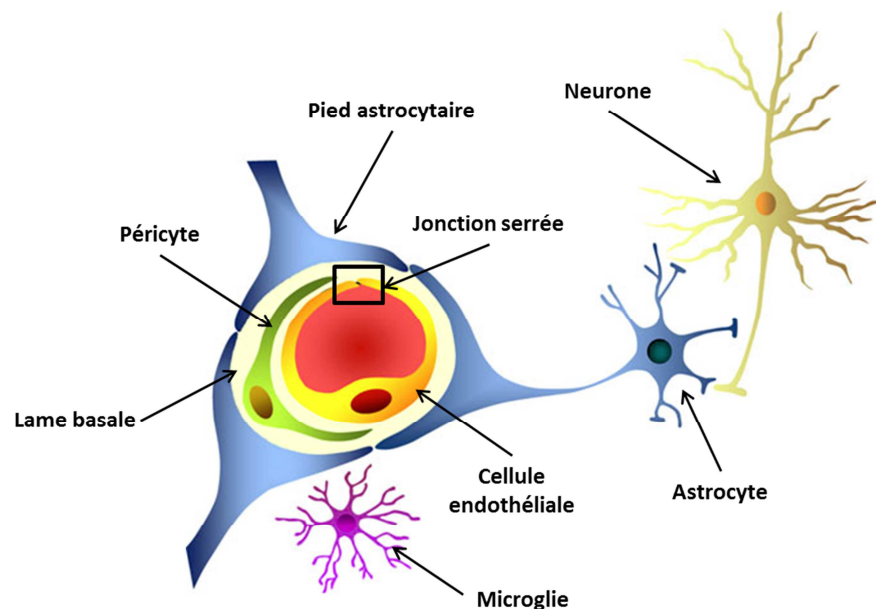


Figure I-2 : Représentation d'une coupe d'un capillaire cérébral (Abbott 2013).

Les capillaires cérébraux sont morphologiquement similaires aux capillaires périphériques, mais présentent la particularité d'être entourés par des astrocytes, des péricytes et des terminaisons nerveuses comme l'illustre la figure I-2 (Abbott et al. 2006; Risau & Wolburg 1990). Les péricytes sont en contact étroit avec les cellules endothéliales, et bien que leurs fonctions au sein de la BHE ne soient pas encore totalement comprises, ils expriment notamment des protéines contractiles permettant la régulation du débit sanguin cérébral local (Bandopadhyay et al. 2001). Les astrocytes encapsulent ce complexe péricytes/cellules endothéliales via les pieds astrocytaires (Kacem et al. 1998), et relient ainsi les cellules endothéliales aux neurones environnants, leur conférant un rôle de cohésion du SNC. Les astrocytes jouent en outre un rôle primordial dans le développement et l'expression de la BHE (Wolburg et al. 2009).

L'imperméabilité de la BHE est majoritairement conférée par la proximité physique entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Cet espace intercellulaire se caractérise par la

présence de jonctions adhérentes (JA) et de jonctions serrées (JS) représentées sur la figure I-3. La fonction principale des JA est de lier les cellules endothéliales entre elles, garantissant ainsi la cohésion du tissu. Elles sont majoritairement constituées par des cadhérines (Bazzoni & Dejana 2004), des glycoprotéines transmembranaires tapissant la surface des capillaires. Un complexe formé d' α -, β - et γ - caténines permet de lier les cadhérines au cytosquelette d'actine.

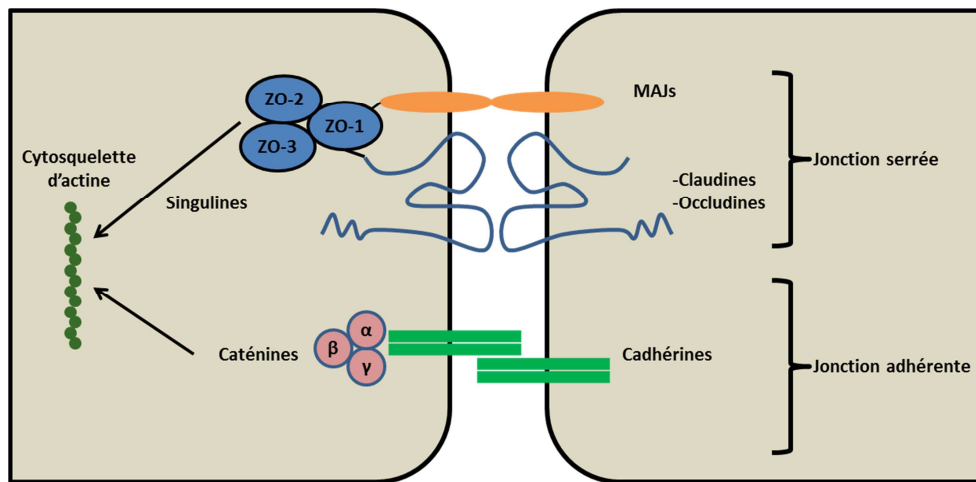


Figure I-3 : Représentation schématique d'une jonction serrée.

Bien que les JA soient essentielles à la formation des JS (Wolburg & Lippoldt 2002), ce sont ces dernières qui sont principalement responsables de la faible perméabilité de la BHE. Le passage paracellulaire entre les cellules endothéliales des capillaires est si drastiquement réduit que même l'échange d'ions tels que le sodium entre le SNC et le compartiment sanguin est limité, ce qui se manifeste par une augmentation significative de la résistance électrique transmembranaire des capillaires cérébraux qui atteint environ $1800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ contre $10 \Omega \cdot \text{cm}^2$ pour les capillaires périphériques (Butt et al. 1990).

Les JS sont essentiellement constituées d'un complexe formé d'occludines et de claudines, des protéines transmembranaires, et de molécules d'adhésion et de jonction (MAJ). Les claudines et les occludines sont reliées au cytosquelette par le biais des protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (Abbott et al. 2010). Les MAJ et les claudines participent principalement au développement et au maintien des JS, tandis que les occludines sont impliquées dans la régulation de la barrière, notamment afin de réagir aux variations de composition plasmatique. Enfin, notons que des dysfonctions de la BHE ont été notées dans un certain nombre de pathologies cérébrales comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, l'épilepsie ou les tumeurs (Abbott et al. 2010). Ces dysfonctions peuvent se caractériser par des ouvertures transitoires et ponctuelles des JS, voire par une perméabilisation chronique de la BHE, notamment dans le cas des tumeurs cérébrales (Schlageter et al. 1999)(Couture et al. 2014).

I-1.3. Transport de molécules à travers la BHE

Pour assurer l'apport et l'évacuation de composés nécessaires au bon fonctionnement cérébral, il existe différentes voies de passage de la BHE. Bien que certains composés, en particulier de petits agents hydrophiles, puissent diffuser entre les cellules endothéliales, la majorité de ces transports s'effectuent par voie transcellulaire (figure I-4).

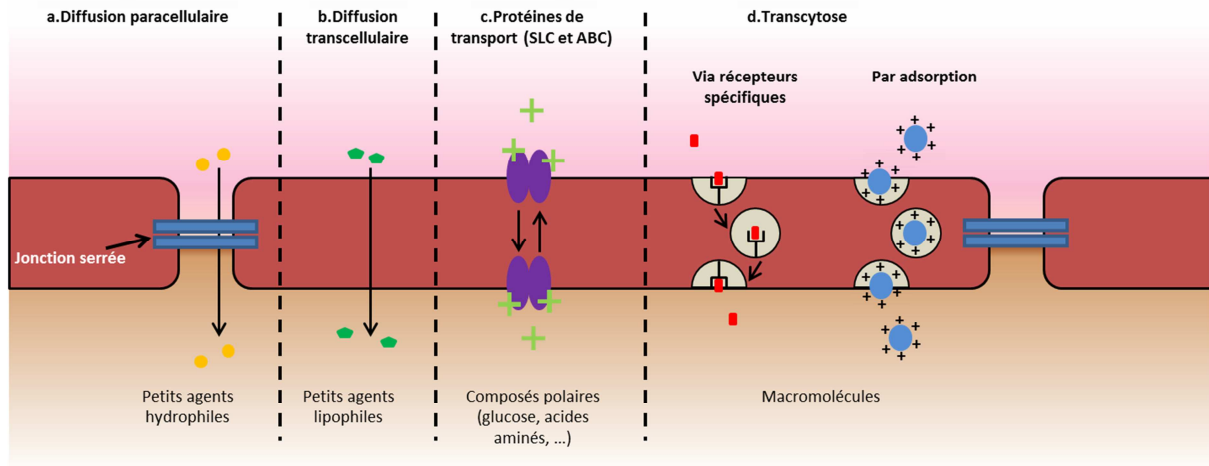


Figure I-4 : Résumé des différentes voies de passage endogènes de la BHE (Abbott et al. 2006).

D'une part, certaines molécules sont capables de diffuser librement à travers les membranes lipidiques des cellules de la BHE. C'est en particulier le cas des molécules lipophiles ou non polaires (Liu et al. 2004). Les gaz sanguins empruntent également cette voie, diffusant selon leur gradient de concentration.

Les petits composés polaires, tels certains ions ou molécules nécessaires au fonctionnement cérébral comme le glucose, sont acheminés vers le SNC par le biais de protéines de transport de la famille des SLC (Solute Carrier) exprimées à la surface des cellules endothéliales (Ohtsuki & Terasaki 2007; Bernacki et al. 2008). D'autres protéines, principalement de la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) telles que la glycoprotéine P, sont impliquées dans l'évacuation des déchets ou molécules toxiques (Kalvass et al. 2013). Cette action préventive est renforcée par la présence de complexes enzymatiques intracellulaires, en particulier les cytochromes P450s (Dutheil et al. 2010), dont le rôle est de métaboliser les éventuels neurotoxiques introduits par les protéines de transport.

Enfin les molécules de taille plus importante comme certaines protéines sont transportées vers les tissus cérébraux par des voies de transcytose spécifiques. Les deux principaux mécanismes identifiés sont la transcytose par adsorption pour des macromolécules chargées positivement, et la transcytose associée à des récepteurs (Hervé et al. 2008; Candela et al. 2010; Tucker et al. 2012).

I-2. Délivrance de médicaments au cerveau : différentes méthodes de passage de la BHE

La BHE constitue donc une barrière extrêmement imperméable protégeant le SNC, mais nous comprenons qu'elle va également restreindre voire empêcher l'accès de molécules thérapeutiques au cerveau. En effet, environ 80 % des petites molécules et 100 % des grosses molécules ne peuvent pas franchir cette barrière (Pardridge 2012). Pour illustrer ce propos, sur plus de 6000 molécules actives recensées sur la base de données du Comprehensive Medicinal Chemistry (CMC), seules 5 % sont utilisées pour des affections du cerveau, et traitent uniquement un nombre limité de pathologies dont la dépression, la douleur chronique, l'épilepsie et l'insomnie (Pardridge 2005). Afin de pouvoir délivrer un plus large panel de molécules en vue de traiter un nombre plus important de pathologies cérébrales (maladie d'Alzheimer, de Parkinson, glioblastomes, ...), il est nécessaire de

développer des stratégies permettant de passer la BHE, avec toutefois la contrainte de préserver au maximum son intégrité étant donné son rôle essentiel. Nous présentons ici les principales approches ayant été envisagées en rappelant leurs éventuelles limites à une application en routine clinique.

I-2.1. Injection intracrânienne

Une première méthode envisagée a été l'injection locale d'agents thérapeutiques dans le SNC. Trois approches différentes ont été étudiées : l'injection intracérébrale (Krewson et al. 1995), l'infusion intra-cérébroventriculaire (Yan et al. 1994) et le transport convectif ou CED (Ai et al. 2003). Pour chacune de ces techniques, le médicament est délivré *in situ*, ce qui présente comme avantage de diminuer les doses à injecter et de réduire de fait la toxicité systémique. Néanmoins, la diffusion des molécules dans le cerveau étant fortement restreinte par sa structure, la dose effectivement délivrée à distance du site d'injection est relativement faible, ce qui rend ces techniques peu efficaces notamment pour traiter de larges régions.

D'autre part, chacune de ces techniques requiert l'implantation d'un cathéter intracrânien, et ces méthodes ont montré d'importantes limitations (Aebischer & Ridet 2001). En outre, ceci nécessite une intervention neurochirurgicale pour chaque patient, ce qui est peu compatible avec le nombre de personnes à traiter, et altère le rapport bénéfice/risque de la démarche thérapeutique. En effet, si l'on considère la seule maladie d'Alzheimer, une étude de 2005 estimait le nombre de personnes atteintes au niveau mondial à environ 24 millions, avec 4,5 millions de nouveaux cas chaque année (Ferri et al. 2005).

Finalement d'autres études ont mis en évidence des effets secondaires importants, notamment la formation d'astroglioses diffuses le long des fibres de matière blanche après l'application de la méthode CED (Ai et al. 2003).

Sur ce point, il est à noter que les travaux menés par Benjamin Marty pendant sa thèse dans notre équipe ont montré que la diffusion d'agents de contraste après injection intracérébrale correspondait à une tortuosité du tissu cérébral plus élevée qu'attendue. Notre hypothèse, vérifiée dans le dernier chapitre de cette thèse, est que les réactions inflammatoires induites par l'injection perturbent la pharmacocinétique, ce qui n'est pas le cas en utilisant la méthode ultrasonore.

Il paraît donc difficile d'envisager ces techniques comme une manière sûre et reproductible de passer outre la BHE en routine clinique.

I-2.2. Ingénierie moléculaire et façonnage biochimique

Nous avons vu que malgré l'imperméabilité de la BHE, il existait des voies de transport de certaines molécules du sang vers le SNC. Il peut donc être envisagé de profiter de ces voies de passage naturelles pour franchir la BHE.

I-2.2.a) Diffusion libre de composés lipophiles

Dans un premier temps, les molécules de poids moléculaires inférieurs à 400 Da et suffisamment lipophiles, c'est-à-dire formant moins de 8 à 10 liaisons hydrogènes avec leur solvant, peuvent diffuser librement à travers la BHE (Pardridge 2005). Il est donc possible de transformer certaines molécules hydrosolubles en molécules liposolubles par l'ajout de groupements lipidiques,

leur conférant ainsi la capacité de pénétrer dans le SNC. L'inconvénient principal de cette méthode est qu'elle se limite à des molécules de taille inférieure à 400-450 Da (Abbott et al. 2010)(Fischer et al. 1998), excluant un nombre important de potentiels agents thérapeutiques.

I-2.2.b) Utilisation de mécanismes de transports actifs endogènes

Pour délivrer des molécules trop hydrophiles et/ou de tailles trop importantes, les voies de transport actives précédemment listées peuvent également être utilisées. Il existe majoritairement deux solutions.

Voies utilisant des transporteurs

La première utilise les protéines de transport (principalement du glucose et des acides aminés) présentes à la surface des cellules endothéliales de la BHE, qui permettent par exemple de délivrer la L-dopa pour le traitement de la maladie de Parkinson ou encore la gabapentin (Abbott et al. 2010)(Zhang et al. 2002). La découverte d'un transport actif de ces molécules fut un effet d'aubaine imprévu et donc marginal.

Transcytoses régulées par la reconnaissance de récepteurs à la surface des cellules endothéliales de la BHE

La seconde approche consiste à fonctionnaliser la molécule thérapeutique avec un ligand spécifique des cellules endothéliales de la BHE, afin d'activer l'endocytose puis la transcytose du complexe médicament/ligand. Ces stratégies visent principalement les récepteurs à l'insuline, la transferrine et les LDL (« Low Density Lipoprotein ») (Gabathuler 2010). L'équipe de Patrick Couvreur a par exemple montré qu'il était ainsi possible de délivrer au SNC des protéines transportées par des nanoparticules fonctionnalisées (Yemisci et al. 2015; Karatas et al. 2009). D'autres études précliniques ont montré qu'il était également possible de délivrer des liposomes (Schnyder & Huwyler 2005) ou encore des siARN (Pardridge 2007). Malheureusement, la fonctionnalisation ou la transformation de ces molécules sont généralement compliquées, longues et très coûteuses. En outre, le développement mis en œuvre doit être renouvelé pour chaque nouvelle molécule candidate à un traitement.

I-2.3. Perméabilisation artificielle transitoire de la BHE par voie chimique

Une troisième approche étudiée vise à augmenter provisoirement la perméabilité de la BHE par l'injection intraveineuse d'un agent chimique. Différentes molécules ont été testées dont des agents vasoactifs tels que la bradykinine (Cloughesy & Black 1995), des solvants (Hanig et al. 1972) ou encore des agents alkylants (Lee et al. 2002), mais l'une des approches les plus étudiées est l'injection intracarotidienne de solutions hypertoniques telles que le mannitol (Neuwelt et al. 1985)(Guillaume et al. 2010). La solution hyperosmotique entraîne une rétraction des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, augmentant provisoirement l'espace entre les JS et facilitant ainsi le passage de grosses molécules vers le SNC par voie paracellulaire. De nombreuses études ont démontré l'intérêt de cette technique pour la délivrance de chimiothérapies au cerveau, et des essais cliniques prometteurs ont déjà été réalisés pour le traitement de certaines tumeurs cérébrales (Doolittle et al. 2000; Guillaume et al. 2010).

Ces techniques ont néanmoins présenté plusieurs complications. La perméabilisation étant globale, un certain nombre d'agents neurotoxiques, endogènes ou non, peuvent accéder au parenchyme cérébral, comme par exemple l'albumine sérique (Begley & Brightman 2003). D'autres études ont également rapporté des crises d'épilepsie focale (Doolittle et al. 2000), ou des symptômes vagues se traduisant par de l'hypotension ou de la bradychardie (Bellavance et al. 2008). Enfin, la concentration requise pour créer un choc osmotique étant importante, des procédures chirurgicales de clamp temporaire sont proposées mais elles occasionnent une grande lourdeur expérimentale (expertise requise par l'équipe soignante et manque de reproductibilité).

Pour résumer, cette méthode a prouvé son efficacité mais reste relativement invasive. Il serait donc intéressant de pouvoir obtenir une telle perméabilisation transitoire de la BHE, mais en réduisant les potentiels effets secondaires.

I-3. Perméabilisation transitoire de la BHE par ultrasons focalisés

L'utilisation des ultrasons dans le domaine médical est aujourd'hui largement répandue. Les examens échographiques font partie de la routine clinique depuis longtemps, et l'application des ultrasons en tant qu'outil thérapeutique est un domaine en expansion. En effet, ils présentent de nombreux avantages dont la possibilité de traiter des organes situés en profondeur de façon peu invasive et en un temps réduit, avec des complications post-traitement limitées et un coût relativement modéré.

Les effets induits par les ultrasons sur les tissus sont à la fois mécaniques et thermiques. Cette variété d'interactions permet d'envisager différents types de traitement. Ainsi, ils ont déjà montré leur potentiel dans de nombreuses applications cliniques, telles que le traitement par ablation thermique des cancers de la prostate (Bihrlé et al. 1994)(Blana et al. 2008; Uchida et al. 2009), des métastases osseuses (Liberman et al. 2009; Lam et al. 2015) ou des carcinomes hépatiques (Wu et al. 2004; Aubry et al. 2013). Concernant les effets mécaniques, des études précliniques ont montré le potentiel des ultrasons pour la lithotripsie (Bailey et al. 2003) ou l'histotripsie (Roberts 2014). Jusqu'à présent, l'accès au cerveau était limité par la présence du crâne, qui absorbe une grande partie de l'énergie ultrasonore créant des échauffements à sa surface et provoque une atténuation et une défocalisation du faisceau ultrasonore (moins d'énergie au point focal, et apparition de points chauds dont la localisation n'est pas contrôlée), ce qui obligeait généralement à effectuer une crâniectomie. Néanmoins, les évolutions technologiques permettent aujourd'hui d'envisager des traitements moins invasifs, et des études cliniques ont récemment montré des résultats prometteurs pour l'utilisation des ultrasons focalisés dans le traitement de certaines pathologies cérébrales (Elias et al. 2013; Martin et al. 2009).

La perméabilisation de la BHE par l'application d'ultrasons focalisés avait déjà été observée dans les années 1950 (Barnard et al. 1955). L'explication avancée pour ce phénomène est une interaction entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, et les microbulles créées par cavitation suite à l'application des ultrasons à haute intensité. Néanmoins, le phénomène induisait dans certains cas une nécrose des tissus cérébraux (Bakay et al. 1956; Ballantine et al. 1960) et cette technique avait donc été jugée trop délétère pour être transférée vers une utilisation clinique.

En 2001, Hynynen et son équipe ont présenté une nouvelle stratégie permettant de perméabiliser la BHE transitoirement et de façon réversible en combinant l'injection de microbulles

par voie intraveineuse et l'application d'ultrasons focalisés de basse intensité et pulsés (Hynynen & McDannold 2001). Les microbulles utilisées sont constituées d'un gaz encapsulé dans une coque formée de lipides ou d'albumine, et sont pour certaines disponibles sur le marché et autorisées en injection clinique en tant qu'agents de contraste ultrasonore. En potentialisant l'action des ultrasons, elles permettent de diminuer significativement l'intensité acoustique à utiliser pour observer des effets biologiques, résultant en une perméabilisation de la BHE possible sans aucun dommage neuronal observé. Cette technique a déjà démontré des résultats très prometteurs sur des modèles animaux, permettant d'augmenter la dose locale délivrée pour de nombreux agents thérapeutiques (voir tableau I-1). Durant les dernières années, de nombreux efforts ont été déployés pour essayer de comprendre les mécanismes mis en jeu et ainsi d'optimiser le protocole afin de maximiser son efficacité et sa sécurité. Grâce à ces différents travaux, deux études cliniques sont aujourd'hui en cours avec des applications en cancérologie. La première, initiée en 2014, envisage une approche invasive avec l'utilisation du système implanté SonoCloud® (Carthera, France) (Assistance Publique Hôpitaux de Paris 2014). La seconde, initiée en 2015, utilise le système multivoies transcranien guidé par IRM ExAblate® (Insightec) (Insightec 2015).

| Therapeutic agent | Size | Use | Delivered to |
|---|------------------------|--|---|
| Temozolomide | 194 Da | Chemotherapy | Glioma model (9L) ^a [141] |
| 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) ^b | 214 Da | Chemotherapy | Glioma model (C6) ^a [138,152] |
| Cytarabine | 243 Da | Chemotherapy | Normal brain [140] |
| Boronophenylalanine | 330 Da | Agent for boron neutron capture therapy | Glioma models (GBM 8401 [149]; 9L [150]) |
| Doxorubicin | 540 Da | Chemotherapy | Normal brain [96] |
| Methotrexate | 545 Da | Chemotherapy | Normal brain [139] |
| siRNA | ~13 kDa | Huntington's disease therapy | Normal brain [135] |
| Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) ^b | 24 kDa | Neuroprotective agent | Normal brain [153] |
| Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) | 27 kDa | Neuroprotective agent | Normal brain ^c [156] |
| Herceptin (trastuzumab) | 148 kDa | Anti-cancer antibody | Normal brain [147]; breast cancer brain met. model (BT474) ^a [148] |
| BAM-10 A β targeted antibodies | ~150 kDa | Therapeutic antibody for Alzheimer's disease | TgCrND8 Alzheimer's model mice ^a [158] |
| BCNU-VEGF ^b | ~150 kDa | Antiangiogenic-targeted chemotherapy | Glioma model (C6) ^a [155] |
| Plasmid DNA (pBDNF-EGFP) ^b | ~3600 kDa ^d | Gene therapy | Normal brain [154] |
| Epirubicin in magnetic nanoparticles | ~12 nm | Magnetic targeted chemotherapy | Glioma model (C6) ^a [144] |
| Doxorubicin in magnetic nanoparticles ^b | ~6–10 nm | Magnetic targeted chemotherapy | Glioma model (C6) [146] |
| BCNU in magnetic nanoparticles | ~10–20 nm | Magnetic targeted chemotherapy | Glioma model (C6) ^a [145] |
| Adeno-associated virus (AAV) | ~25 nm | Gene therapy vector | Normal brain [160–162] |
| Liposomal doxorubicin (Lipo-DOX) | 90 nm | Chemotherapy | Normal brain [83]; Glioma model (9 L) ^a [142,163] |
| Interleukin-4 receptor targeted Lipo-DOX | 100–120 nm | Chemotherapy | Glioma model (8401) [143] |
| Neural progenitor cells | 7–10 μ m | Stem cell | Normal brain [159] |
| Natural killer cells (NK-92) | ~10 μ m | Cell therapy for brain tumor | Breast cancer brain met. model (MDA-MB-231-HER2) [151] |

^a Also showed improved outcomes with FUS-induced BBB disruption.

^b Used drug-loaded microbubbles.

^c Also showed drug activity after delivery.

^d Assumed 660 Da per base pair (bp), 760 bp for BDNF, and 4700 bp for pEGFP-N1.

Tableau I-1 : Différents agents thérapeutiques délivrés grâce à la perméabilisation de la BHE par ultrasons (Aryal et al. 2014).

I-3.1. Les mécanismes impliqués

Malgré de nombreuses études sur le sujet, le mécanisme exact conduisant à la perméabilisation transitoire de la BHE suite à l'application d'ultrasons focalisés reste encore relativement mal compris.

Il existe deux régimes de cavitation qui sont essentiellement déterminés par la valeur de la pression acoustique : à basse pression, les microbulles oscillent à la fréquence de l'onde ultrasonore, on parle de cavitation stable (Hsieh & Plesset 1961), tandis que pour des valeurs de pressions trop élevées la taille des bulles va fortement augmenter ce qui peut les amener à effondrer, on parle de cavitation inertielle (Flynn 1964). Des études ont montré que la perméabilisation de la BHE pouvait être obtenue sans élévation de température des tissus (Hynynen & McDannold 2001), et en l'absence de cavitation inertielle (McDannold et al. 2006). Notons que cette dernière doit d'ailleurs être évitée

car d'autres études ont montré qu'elle pouvait induire d'importants dommages tissulaires du fait de la violence du phénomène (McDannold et al. 2006)(Tung et al. 2010)(Arvanitis et al. 2012).

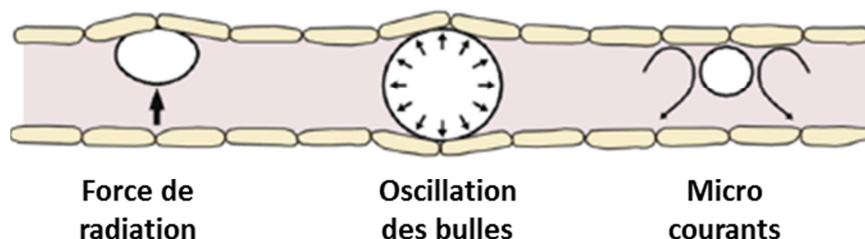


Figure I-5 : Effets de la cavitation stable potentiellement responsables de la perméabilisation de la BHE (Vykhodtseva et al. 2008).

Il reste donc les effets mécaniques induits lors de la cavitation stable des microbulles, dont plusieurs d'entre eux sont potentiellement impliqués dans la perméabilisation de la BHE (figure I-5). Une première hypothèse est liée à la force de radiation acoustique, qui va « pousser » les microbulles contre les parois des capillaires sanguins (Dayton et al. 1999), ce qui pourrait engendrer une activation de certains récepteurs mécano-sensibles. Une autre hypothèse formulée met en jeu les forces de cisaillement induites à la surface des cellules endothéliales par des micro-courants créés par l'oscillation des bulles. Néanmoins, la question reste ouverte pour savoir si l'oscillation des bulles sous un champ acoustique induit une modification physique de la structure des parois des capillaires (Sheikov et al. 2004)(Sheikov et al. 2008), ou bien si elle active une réponse physiologique menant à la perméabilisation transitoire de la BHE (Raymond et al. 2007)(Sheikov et al. 2006). La réponse est probablement une combinaison de plusieurs effets.

Notons enfin que le phénomène de perméabilisation dure plus longtemps que l'application des ultrasons. Au cours de sa thèse, Benjamin Marty a étudié la dynamique de ce phénomène (Marty et al. 2012; Marty 2012). Il a montré que la perméabilité de la BHE tend dans un premier temps à augmenter suite à l'application des ultrasons, puis la barrière se referme progressivement. D'autre part, il apparaît que les molécules de plus petite taille peuvent franchir la BHE durant une durée plus importante, jusqu'à 24 heures pour du Dotarem®.

I-3.2. Influence des bulles et des paramètres acoustiques sur la perméabilisation de la BHE

Nous avons vu que le phénomène était transitoire et réversible, néanmoins des dommages peuvent être observés dans certaines conditions, notamment en présence de cavitation inertielle. Ils seront abordés plus en détails dans le chapitre V. De nombreuses études ont donc cherché à caractériser l'influence des paramètres acoustiques ainsi que de la nature des bulles, afin d'obtenir une perméabilisation qui soit la plus efficace possible, tout en répondant à certains critères de sécurité, en particulier l'absence de dommages irréversibles et un temps de retour à l'état basal qui soit raisonnable. Nous rappelons brièvement les principaux résultats.

Nous allons utiliser dans ce paragraphe la notion d'efficacité de perméabilisation de la BHE. Afin que la suite du propos soit plus claire pour le lecteur, nous précisons que la méthode généralement utilisée pour visualiser la perméabilisation consiste à injecter un agent de contraste

IRM normalement incapable de franchir la BHE (cf figure I-1). En réalisant ensuite des acquisitions d'images IRM correctement pondérées, on observera un réhaussement ou une diminution du contraste (selon l'agent utilisé) à l'endroit de la perméabilisation si celle-ci a fonctionné. On parlera généralement de perméabilisation plus efficace lorsque le changement de contraste est plus important. Parmi les autres méthodes employées, on peut également citer l'injection intraveineuse d'un agent coloré normalement incapable de franchir la BHE, tel que le bleu Evans ou des dextrans de poids moléculaires connus. En extrayant ensuite le cerveau, on observera une coloration uniquement dans les régions où la BHE a été perméabilisée.

Les paramètres variables lors d'un tir ultrasonore sont les suivants : la fréquence de l'onde mécanique (f_{ac}), la pression acoustique (P_{ac}), la durée d'un train d'onde ou « burst » (T_b), la fréquence de répétition des burst (f_r) et enfin la durée totale de la séquence ultrasonore (T_{tot}).

Plusieurs études ont montré qu'une augmentation de P_{ac} augmentait la quantité de molécules délivrées, mais que la quantité délivrée semblait saturer au-delà d'une certaine valeur de P_{ac} (Hynynen et al. 2005; Chopra et al. 2010). Elles notent également qu'il existe un seuil de pression à dépasser pour obtenir une perméabilisation, et que ce seuil semble diminuer lorsque f_{ac} est diminuée, mais qu'une pression excessive entraîne des dommages potentiellement irréversibles. Afin d'unifier ces résultats, une étude a montré que l'index mécanique offrait une bonne prévision des seuils de perméabilisation (McDannold et al. 2008a).

Une augmentation de T_b jusqu'à une durée d'environ 10 ms semble produire une perméabilisation plus efficace, tandis qu'au-delà de cette durée on n'observe plus de différence (McDannold et al. 2008b)(Choi, Selert, Vlachos, et al. 2011). L'effet de f_r est moins clair puisque certaines études ont montré qu'une augmentation de la fréquence des bursts engendrait une perméabilisation plus efficace (Choi, Selert, Gao, et al. 2011), tandis que d'autres n'ont pas noté d'influence de ce paramètre (McDannold et al. 2008b).

Reported effects of different parameters on BBB disruption via FUS and microbubbles.

| Parameter | Effect on BBB disruption |
|--------------------------------|---|
| Pressure amplitude | Increase in BBB disruption magnitude as pressure amplitude increases; saturation at some point [82-84]; vascular damage produced at high pressure amplitudes. |
| Ultrasound frequency | Decrease in BBB disruption threshold as frequency decreases; some evidence of improved safety for lower frequencies [85]. |
| Burst length | For burst lengths less than 10 ms, BBB disruption threshold increases and BBB disruption magnitude decreases as burst length is reduced [86,90-92]; little or no increase in disruption magnitude for longer bursts [77,81,90]. |
| Pulse repetition frequency | BBB disruption magnitude increases as repetition frequency increases up to a point [90]. Other works have observed no effect on BBB disruption magnitude [86]. |
| Ultrasound contrast agent dose | Magnitude of BBB disruption increases with dose [83,90,94,188]; other experiments have reported no effect [86]. |
| Sonication duration | Longer durations [84] or repeated sonication [96,97] increase magnitude of BBB disruption; damage reported with excessive sonication [84,97]. |
| Microbubble diameter | Threshold for BBB disruption lower for larger microbubbles; disruption magnitude increased with larger microbubbles [87-89]. |
| Ultrasound contrast agent | Similar outcomes reported for Optison® and Definity® microbubbles [189]. Sonovue® microbubbles and research agents are also commonly used. |

Tableau I-2 : Résumé des effets rapportés dans la littérature en fonction de différents paramètres acoustiques (Aryal et al. 2014)

Augmenter T_{tot} rend la perméabilisation plus efficace dans la limite de durée de vie plasmatique des microbulles (Chopra et al. 2010), cependant une exposition trop longue conduit à des dommages tissulaires (Yang et al. 2011; Chopra et al. 2010).

Le tableau I-2 résume l'ensemble de ces observations.

Concernant les microbulles, il a été montré que l'augmentation de la dose injectée entraînait une perméabilisation plus efficace (Yang et al. 2007; Treat et al. 2007), et un effet similaire a été observé en utilisant des microbulles de taille plus importante (Choi et al. 2010; Samiotaki et al. 2012). Néanmoins, leur taille maximale ne doit pas excéder le diamètre des plus petits capillaires (8 μm environ) pour éviter tout risque d'embolie. Les bulles commerciales sont polydisperses avec une gamme de tailles typiques comprises entre 0 et 8 μm . Enfin, il est à noter que la perméabilisation de la BHE a pu être observée avec différents types de microbulles comme le montre le tableau I-3 (Liu et al. 2014). L'impact exact des propriétés de ces microbulles (distribution de taille, propriétés de la coque, nature du gaz) sur l'efficacité de la perméabilisation n'a pas encore été complètement élucidé, mais ces différences sont à prendre en considération et peuvent expliquer une partie de la variabilité des réponses observées dans les différentes études.

| MB type | Manufacturer | Shell material | Gas | Mean size (μm) | Concentration (bubbles/mL) | MB half-life (minutes) |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Optison™ | GE Healthcare | Albumin | C ₃ F ₈ | 2.0–4.5 | 5.0–8.0×10 ⁹ | 2.5–4.5 |
| Definity® | Lantheus Medical Imaging | Phospholipid | C ₃ F ₈ | 1.1–3.3 | 1.2×10 ¹⁰ | 2–10 |
| SonoVue® | Bracco | Phospholipid | SF ₆ | 2–8 | 0.9–6×10 ⁹ | 3–6 |
| Lipid MBs [103] | Self-made | Phospholipid/ Lipo-polymer | C ₃ F ₈ | 0.2–0.7 | 1.4–3.0×10 ¹⁰ | 10–20 |
| BCNU-loaded MBs [103] | Self-made | Phospholipid | C ₃ F ₈ | 1.32 ±0.18 | 19.78 ±4.9×10 ⁹ | 10–20 |
| Antiangiogenic BCNU-loaded MBs [104] | Self-made | Phospholipid | C ₃ F ₈ | 1.79 ±0.13 | 12.29 ±0.25×10 ⁹ | 10–20 |
| SPIO-DOX -loaded MBs [105] | Self-made | Phospholipid | C ₃ F ₈ | 1.04 ±0.01 | 3.25 ±0.30×10 ¹⁰ | 10–20 |

Tableau I-3 : Différents types de microbulles pouvant être utilisées pour perméabiliser la BHE (Liu et al. 2014).

Nous noterons que malgré le nombre important d'études menées sur le sujet, il existe encore un certain nombre de résultats contradictoires, et l'on peut donc uniquement distinguer quelques grandes tendances sur le rôle des paramètres acoustiques. Il est donc nécessaire de compléter ces résultats afin d'optimiser le protocole avant de pouvoir l'appliquer en clinique avec la meilleure garantie d'efficacité mais également de sécurité. Le chapitre V présentera un état de l'art des caractérisations histologiques menées par les différentes équipes suite au protocole d'ouverture de BHE par ultrasons.

Pour conclure, le tableau I-4 résume les avantages et inconvénients des différentes techniques présentées pour délivrer des médicaments aux tissus cérébraux.

| | Ultrasons focalisés + microbulles (Guidés par IRM/hors IRM) | Injection intracérébrale | Perméabilisation par voie chimique (mannitol, ...) | Ingénierie moléculaire | |
|---|---|--------------------------|--|------------------------|------------------------------|
| Non-invasif | ✓ | X | ✓ | ✓ | |
| Localisé | ✓ | ✓ | X | ✓ | ✓ Favorable X Défavorable |
| Spectre thérapeutique | ✓ | ✓ | ✓ | X (reformulation) | |
| Vitesse d'application d'un nouveau traitement | ✓ | ✓ | ✓ | X | |
| Coût | X/✓ | ✓ | ✓ | X | |
| Reproductibilité | ✓✓/✓ | X | ✓? (différences rapportées) | ✓✓ | |
| Innocuité | ✓ | X | ✓ | ✓ | |
| Quantitatif (sous conditions) | ✓/X | ✓ | X | ✓ | |
| Expertise technique nécessaire | X | X | X | ✓ | |
| Cadence de traitement (patient/temps) | 1/4h/1/30min | 1/2h | 1/2h | 1/min | |

Tableau I-4 : Avantages et inconvénients des différentes techniques présentées permettant de délivrer des molécules thérapeutiques au cerveau.

I-4. L'IRM comme outil de monitoring de la perméabilisation de la BHE

I-4.1. Bref historique de l'IRM

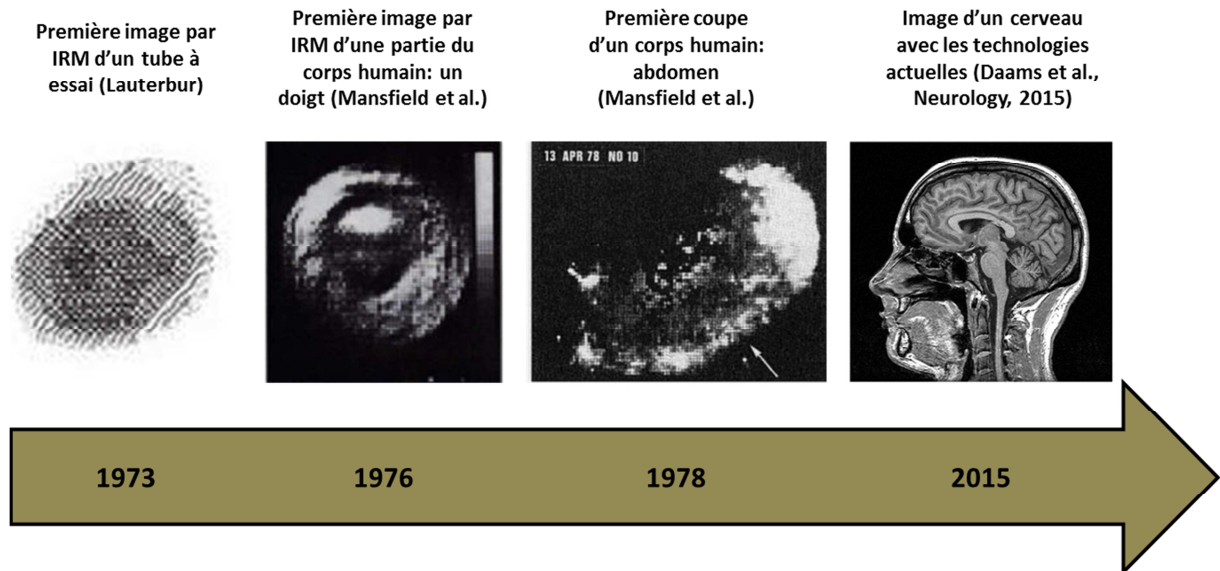


Figure I-6 : Evolution des images IRM.

A l'origine de l'IRM se trouve le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire(RMN), découvert par Rabi en 1937 puis décrit en 1946 par Purcell et Bloch. Elle trouve d'abord son application en chimie dans l'exploration des structures moléculaires, pour laquelle elle est toujours très utilisée aujourd'hui. C'est dans les années 1970 que seront réalisées les premières images utilisant ce phénomène par Lauterbur puis Mansfield. La technique va ensuite connaître un

développement rapide à partir des années 1980, grâce notamment aux progrès technologiques du matériel et de l'informatique, et aux avancées effectuées dans les méthodes d'acquisition. La figure I-6 illustre l'évolution de la qualité des images.

L'imagerie IRM est aujourd'hui largement utilisée en routine clinique. Elle permet en effet d'obtenir un nombre très important d'informations : anatomiques grâce aux contrastes apportés par les propriétés intrinsèques des tissus (densité de protons, T_1 , T_2), connectomiques (imagerie du tenseur de diffusion) ou encore fonctionnelles (imagerie BOLD, diffusion fonctionnelle). Elle offre en outre une très bonne résolution spatiale dans toutes les dimensions de l'espace, voit dans toute la profondeur et présente l'avantage de ne pas utiliser de rayonnements ionisants.

Dans ce paragraphe, nous rappelons brièvement les principes de l'IRM puis nous présentons les avantages de cette technique pour la planification et le suivi d'une perméabilisation de la BHE par ultrasons.

I-4.2. Rappels généraux sur l'IRM

Le phénomène de RMN s'applique à des noyaux atomiques de spin non nul, propriété que possède le noyau d'hydrogène ^1H . Très abondant dans le corps humain du fait de la grande quantité d'eau, c'est majoritairement le proton qui est utilisé pour l'imagerie IRM et nous nous intéresserons ici uniquement à ce noyau.

A chaque proton est associé un moment magnétique de spin $\vec{\mu}$. En l'absence de champ magnétique extérieur, leur orientation est aléatoire. Si l'on applique un champ magnétique extérieur \vec{B}_0 , le spin du proton étant de $1/2$, $\vec{\mu}$ peut prendre deux états : parallèle au champ ou antiparallèle. L'état parallèle étant l'état d'énergie minimale, la population de spins dans l'état parallèle est en léger excès donné par les lois statistiques de Boltzmann. Il en résulte une aimantation macroscopique \vec{M} de l'échantillon considéré à l'équilibre. Bien que le phénomène de RMN soit d'origine quantique, on peut par la suite le décrire en utilisant la physique classique que l'on appliquera à \vec{M} .

Si sous l'effet d'une perturbation l'aimantation n'est plus alignée avec \vec{B}_0 , les moments magnétiques de spin vont entamer un mouvement de précession à une fréquence bien précise appelée fréquence de Larmor f_0 dont la valeur dépend de B_0 et du noyau considéré par le biais de son rapport gyromagnétique γ :

$$f_0 = \gamma B_0 / 2\pi \quad (I.1)$$

A titre d'exemple, la fréquence de Larmor du proton à 7 T vaut 300 MHz.

Le principe d'une mesure en RMN est d'appliquer des impulsions électromagnétiques par le biais d'un champ magnétique \vec{B}_1 tournant à la fréquence de Larmor et perpendiculaire à \vec{B}_0 afin de sortir l'aimantation de son état d'équilibre, puis d'enregistrer le signal radiofréquence (RF) émis lors de son retour à l'équilibre. Ce retour à l'équilibre n'est pas immédiat et se caractérise par des phénomènes de relaxation décrits par les équations de Bloch. On décompose alors \vec{M} en sa composante longitudinale M_z , colinéaire à \vec{B}_0 , et en sa composante perpendiculaire au champ statique appelée aimantation transverse M_{xy} . La valeur de M_z étant très faible par rapport à B_0 , on

ne peut la distinguer de ce dernier. C'est donc la valeur de M_{xy} qui sera enregistrée grâce à des antennes RF positionnées perpendiculairement au champ magnétique statique.

Une première constante de temps T_1 , de l'ordre de quelques secondes dans le cerveau à 7T, décrit le retour à l'équilibre de M_z selon l'équation :

$$M_z(t) = M_0(0)(1 - \exp(-\frac{t}{T_1})) \quad (1.2)$$

L'énergie libérée par les spins lors du retour à l'équilibre de M_z est dissipée dans leur environnement, on parle de relaxation « spin-réseau ».

La disparition de l'aimantation transverse M_{xy} se fait quant à elle selon l'équation :

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)\exp(-\frac{t}{T_2}) \quad (1.3)$$

Initialement en phase après l'impulsion RF, les spins vont perdre leur cohérence par le fait d'échanges d'énergie avec les spins voisins, ce qui induit la disparition de M_{xy} . On parle alors de relaxation « spin-spin ». La constante de temps T_2 est de l'ordre de quelques millisecondes à quelques dizaines de millisecondes. Les phénomènes de relaxation transversale et longitudinale sont illustrés sur la figure I-7.

L'homogénéité du champ statique n'étant pas parfaite (inhomogénéités venant d'imperfections de l'aimant mais aussi de la perturbation apportée par l'échantillon ou le patient lui-même), les variations locales de \vec{B}_0 entraînent de petites différences dans les fréquences de Larmor des spins, ce qui accélère leur déphasage et donc la disparition de M_{xy} selon une loi exponentielle de constante de temps T_2^* , plus courte que T_2 . Notons que contrairement aux deux autres phénomènes de relaxation qui sont irréversibles, la perte de cohérence et donc de signal gouvernée par T_2^* peut être compensée par les séquences de type écho de spin.

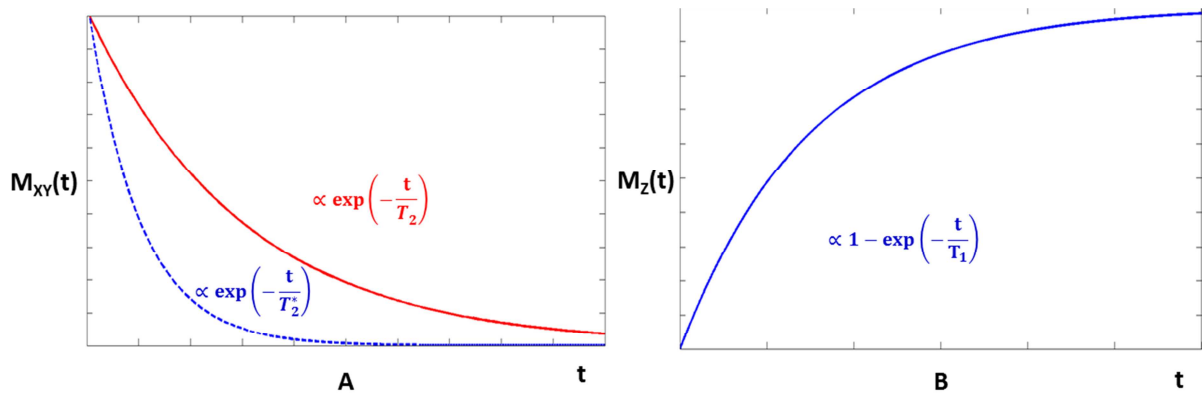


Figure I-7 : A. Relaxation de l'aimantation transverse avec la constante de temps T_2 (champ statique homogène) ou T_2^* (inhomogénéités de champ magnétique). B. Retour à l'équilibre de l'aimantation longitudinale selon la constante de temps T_1 .

Chacune de ces constantes de temps étant caractéristique du tissu considéré, on peut acquérir des images dont l'intensité est sensible à ces différences, on parlera alors de pondération $T_{i,(i=1,2,2^*)}$. Il est également possible de réaliser une mesure de ces temps grâce à des séquences

particulières de cartographie des temps de relaxation, qui seront abordées plus en détails dans le paragraphe 4.5.2.

Afin de former des images grâce au phénomène de RMN, il est nécessaire d'ajouter des informations de localisation au signal recueilli. Pour ce faire, trois gradients de champ magnétique définissant les trois directions de l'espace se trouvent à l'intérieur du tunnel de l'IRM. De manière simplifiée, lors de l'acquisition d'une image, chacun de ces gradients va s'ajouter au champ magnétique statique, ce qui aura comme résultat un champ magnétique total dont la valeur dépend de la position dans l'espace. Ainsi, la valeur de la fréquence de Larmor des spins de l'échantillon va devenir dépendante de leur localisation, et c'est cette information dite de codage spatial qui permettra de reconstruire l'image finale. Dans une séquence d'acquisition 2D classique, on distingue la direction de sélection de coupe (ou Slice), la direction d'encodage de phase (Phase) et l'axe de lecture ou direction de codage en fréquence (Read).

I-4.3. Imagerie anatomique pour contrôler l'intégrité des tissus

L'imagerie anatomique est certainement l'emploi le plus courant de l'IRM. Elle permet de distinguer les différentes structures anatomiques, en rendant l'image finale sensible aux différentes propriétés physiques intrinsèques des tissus, en particulier la densité de protons, le T_1 et le T_2 comme on peut le voir sur la figure I-8. Un changement tissulaire, par exemple une lésion cancéreuse, va induire un changement de ces propriétés qui peut être visualisé sur les images IRM. Nous rappelons ici brièvement la façon dont on peut pondérer une image par rapport aux temps de relaxation, ainsi que quelques exemples de changements que l'on peut observer.

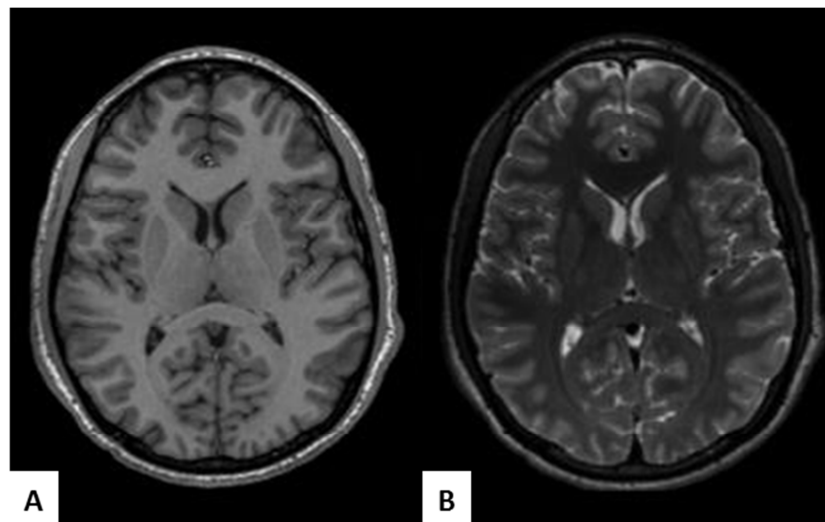


Figure I-8 : Deux images d'un même cerveau humain obtenues avec des pondérations différentes. A. Image pondérée T_1 B. Image pondérée T_2 .

Les paramètres d'une séquence qui vont principalement déterminer la pondération d'une image sont le temps d'écho (TE) et le temps de répétition (TR). TE correspond à la durée entre la mise hors équilibre de l'aimantation, appelée bascule de l'aimantation, et le recueil du signal, tandis que TR correspond au délai entre deux bascules successives. Nous rappelons ici que c'est la valeur de l'aimantation transverse qui est enregistrée par l'antenne lors du recueil d'un signal IRM.

Pour pondérer une image en T_1 , le signal recueilli doit être sensible à la repousse de M_Z mais dépendre le moins possible de la disparition de M_{xy} . En choisissant un TE qui soit court par rapport au T_2 du tissu, on s'assure que la disparition de l'aimantation transverse est limitée, ainsi le signal recueilli dépend principalement de la valeur de l'aimantation longitudinale avant sa bascule. Si on choisit alors un TR qui soit relativement court (typiquement de l'ordre du T_1 des tissus à imager), le signal enregistré dépendra fortement des vitesses de repousse de M_Z , dictées par le T_1 . Les images pondérées T_1 sont notamment utilisées lors d'injection d'agents de contraste paramagnétiques capables de diminuer fortement le T_1 . Ils seront abordés dans le paragraphe suivant.

Si l'on veut maintenant obtenir une image pondérée en T_2 , il s'agit de rendre le signal sensible à la disparition de M_{xy} . Dans ce cas, on choisira un TE de l'ordre du T_2 de l'échantillon. Il est cependant nécessaire que le signal soit indépendant de la repousse de M_Z , on garantira donc que la récupération de l'aimantation longitudinale soit totale en choisissant un TR long par rapport au T_1 .

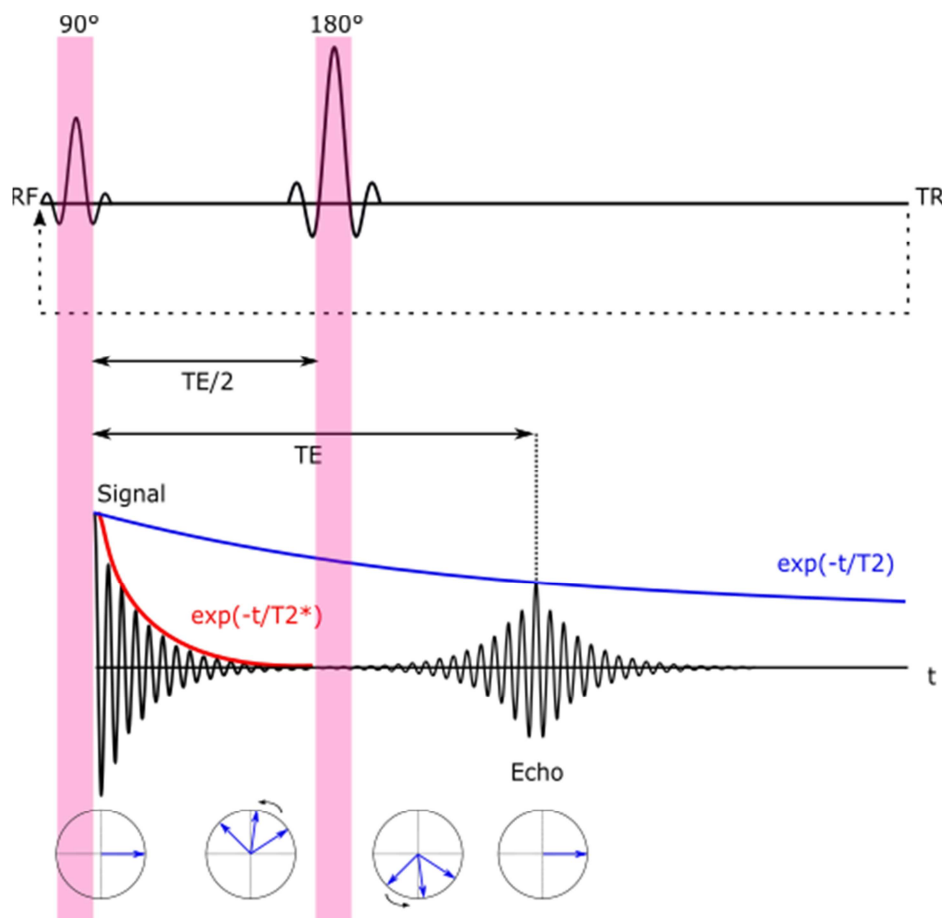


Figure I-9 : Chronogramme et évolution du signal d'une séquence d'écho de spin. Un premier pulse 90° bascule l'aimantation dans le plan transversal. Les spins perdent alors leur cohérence selon une constante de temps T_2^* à cause des inhomogénéités de champ magnétique. Un deuxième pulse de 180° inverse l'aimantation dans le plan transversal. Ils retrouvent progressivement leur cohérence jusqu'à être de nouveau en phase au temps TE : on observe alors un écho dit de spin. L'enregistrement du signal est centré autour de cet écho.

Comme nous l'avons vu, la disparition de l'aimantation transversale va être accélérée par des inhomogénéités de champ magnétique avec une constante de temps T_2^* . Afin de compenser ces inhomogénéités, on peut utiliser des séquences de type écho de spin dont on rappelle le principe sur la figure I-9. La première étape consiste à basculer l'aimantation d'une coupe d'imagerie dans le plan

transverse grâce à une impulsion RF de 90° . On laisse alors les spins évoluer librement durant un délai $TE/2$, durant lequel ils vont se déphaser les uns par rapport aux autres, à cause des effets précédemment cités de relaxation spin-spin d'une part, et d'inhomogénéité de champ magnétique d'autre part. Ce délai est également utilisé pour appliquer un gradient de codage de phase qui va rendre dépendantes les phases des aimantations à leur position selon l'une des directions de l'espace (dite axe de codage de phase). Au temps $TE/2$, un nouveau pulse RF permet de basculer les spins de 180° dans le plan transverse. De manière simplifiée, si les inhomogénéités de champ restent constantes, les spins ayant accumulé une certaine avance lors du premier $TE/2$ vont acquérir un retard équivalent à cette avance durant le délai $TE/2$ suivant le pulse 180° . Au temps TE , les spins se retrouveront alors en phase ce qui induira un signal maximal, d'où le nom d'« écho de spin ». L'enregistrement du signal est centré sur le temps TE . Ce type de séquence permet d'annuler le déphasage induit par les hétérogénéités de champ, ainsi la décroissance de M_{xy} est uniquement due à la relaxation spin-spin, on obtiendra donc une pondération dépendant effectivement de T_2 et non de T_2^* .

Avec ce type de pondération, l'eau libre apparaît hyperintense. Ceci permet donc de détecter la présence d'un œdème cérébral (figure I-10, A). Dans le cas d'une hémorragie, la présence de désoxy-hémoglobine, puis de dépôts d'hemosidérine, va accélérer la perte de cohérence des spins, résultant en une perte de signal. Une hémorragie apparaîtra donc comme un hyposignal (figure I-10, B). Dans les chapitres suivants, ce sont des séquences pondérées en T_2 que nous utiliserons pour vérifier qu'aucun dommage n'a été engendré dans les tissus cérébraux.

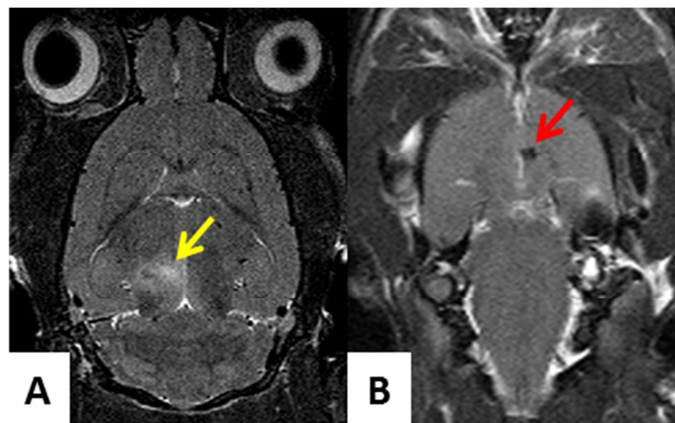


Figure I-10 : Exemples de dommages visibles sur une image pondérée T_2 suite à une expérience d'ouverture de BHE par ultrasons focale à pression acoustique excessive. A. La flèche jaune indique un œdème se traduisant par un hypersignal dû à l'épanchement liquidien. B. La flèche rouge indique une hémorragie se traduisant par un hyposignal dû à la présence de fer dans le sang.

I-4.4. Voir les ultrasons par IRM : l'imagerie de la phase

Les signaux acquis en IRM sont rangés dans l'espace de Fourier, selon leurs fréquences spatiales. On effectue alors une transformée de Fourier inverse 2D afin de récupérer l'image dans l'espace image usuel. A la suite de cette transformation, on obtient des données complexes qui contiennent donc une amplitude et une phase. La plupart des images IRM que nous avons l'habitude de voir sont des images en magnitude, néanmoins il est également possible d'utiliser l'image de phase que l'on peut rendre sensible à un certain nombre d'informations. Il est notamment possible

d'observer et même de quantifier certains effets induits par les ultrasons sur les tissus, ce qui fait de l'IRM un outil de choix pour guider les ultrasons focalisés.

I-4.4.a) Effets thermiques : la thermométrie par IRM

Nous avons déjà rappelé que l'application d'ultrasons focalisés sur des tissus pouvait entraîner une élévation de température due à l'absorption de l'énergie acoustique. Cet effet a été largement étudié pour pouvoir réaliser l'ablation thermique de tissus pathologiques, tumoraux par exemple. Afin de contrôler la dose thermique délivrée, il était nécessaire de pouvoir mesurer l'élévation de température induite, et l'IRM s'est révélé être un bon candidat pour ce suivi grâce aux développements de différentes séquences permettant de cartographier la température.

Nous présentons ici la technique de la PRFS (Proton Resonance Frequency Shift). Nous avons vu que sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, les moments magnétiques de spins précessaient à la fréquence de Larmor. Or il a été montré en 1966 par Hindman (Hindman 1966) que pour les noyaux d'hydrogène des molécules d'eau, cette fréquence de résonance était légèrement dépendante de la température. Ainsi, les spins exposés à des températures différentes vont se déphaser les uns par rapport aux autres, et cette information est codée dans la phase de l'image. On peut alors cartographier un changement de température grâce à des séquences IRM dédiées (Quesson et al. 2000; Ishihara et al. 1995; De Poorter et al. 1995).

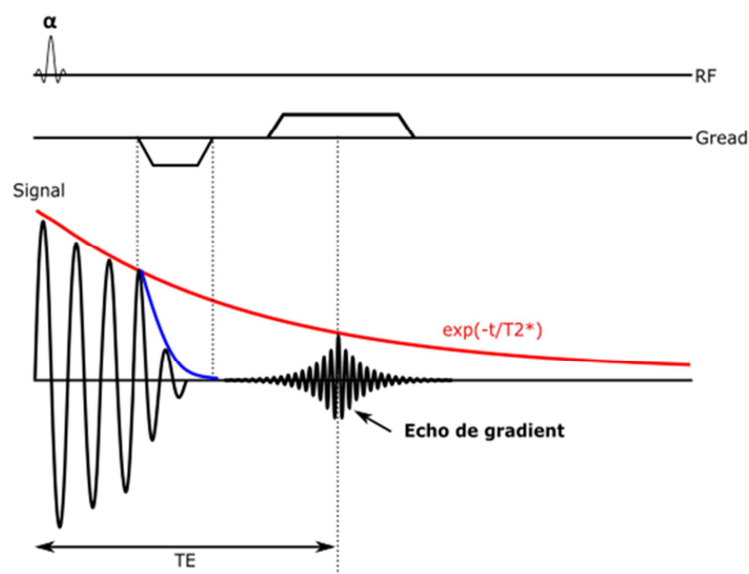


Figure I-11 : Chronogramme et évolution du signal au cours d'une séquence d'écho de gradient. Un pulse d'angle α permet de basculer une portion de l'aimantation dans le plan transversal. Le signal décroît alors selon une constante de temps T_2^* . Un premier lobe de gradient accélère le déphasage des spins, puis un lobe inverse permet de les rephaser partiellement créant un écho de gradient durant lequel le signal est enregistré.

L'élévation de température induite par les ultrasons est un phénomène relativement rapide, de même que la dissipation de la chaleur qui survient lors de l'arrêt des ultrasons. Il est donc nécessaire d'avoir une cadence d'imagerie qui soit suffisante pour pouvoir suivre l'évolution temporelle des variations de température. On va alors utiliser des séquences dérivées de la technique d'écho de gradient dont le principe est rappelé sur la figure I-11. Il s'agit de basculer une partie de l'aimantation dans le plan transverse, par l'application d'un pulse d'angle α ($0 < \alpha \leq 90^\circ$),

puis d'enregistrer le signal de précession libre au bout d'un certain délai TE pendant lequel un gradient de codage de phase est appliqué. Contrairement à l'écho de spin, il n'y pas de pulse 180° de refocalisation des spins. Un gradient bipolaire va être appliqué selon l'axe de codage en fréquence. Le premier lobe va accélérer le déphasage des spins, tandis que le deuxième permettra de les rephaser partiellement créant ainsi un écho dit de gradient. Le recueil du signal sera centré autour de cet écho. Avec ce type de séquences, les TE sont très courts, le signal recueilli est donc plus important. On peut alors accélérer les séquences en utilisant des angles α inférieurs à 90° (séquence FLASH pour Fast Lo Angle SHot). Ainsi, seule une fraction de M_z est basculée, le temps TR nécessaire à sa repousse peut donc être diminué. L'inconvénient principal est que contrairement aux séquences de type écho de spin, les hétérogénéités de champ magnétique ne sont pas compensées ce qui augmente la sensibilité aux artefacts de susceptibilité magnétique (perte de signal et éventuellement distorsion de l'image).

Comme nous l'avons vu, le changement de fréquence de Larmor induit par un changement de température est encodé dans la phase φ de l'image. Afin d'éliminer les variations spatiales de phase dues aux inhomogénéités de B_0 , et donc indépendantes de la température, on acquiert généralement un certain nombre d'images de références φ_{ref} avant d'appliquer les ultrasons. Ces images sont ensuite retranchées des images acquises durant l'application des ultrasons, et l'on peut montrer que la variation de température ΔT (en degrés) est proportionnelle à la variation de phase mesurée selon la relation :

$$\Delta T = \frac{\varphi - \varphi_{ref}}{\gamma \alpha B_0 TE} \quad (1.4)$$

Dans cette équation, la phase est exprimée en nombre de cycles. α est le coefficient de dépendance thermique de la fréquence de Larmor, dont la valeur est estimée à 0,01 ppm.°C⁻¹ (Peters et al. 1998)(Vykhodtseva et al. 2000), soit environ 3 Hz.°C⁻¹ à 7 T. On voit également d'après cette équation que la sensibilité de mesure de température est inversement proportionnelle au TE, il s'agit donc de trouver un compromis entre la quantité de signal (qui augmente si TE diminue), et l'amplitude des variations que l'on souhaite mesurer. Pour nos acquisitions, nous avons choisi les paramètres suivants : un TE de 7 ms, associé à un angle de bascule de 10° et un TR de 30 ms. Nous réalisons une seule coupe d'imagerie de 2 mm d'épaisseur, divisée en 64 x 64 voxels pour une résolution dans le plan de 0,5 mm (séquence I-1). L'utilisation de voxels de volumes relativement importants permet d'augmenter le signal reçu, tout en gardant une cadence d'imagerie suffisamment rapide de 1,9 image.s⁻¹.

I-4.4.b) Effets mécaniques : l'imagerie de la force de radiation acoustique

La force de radiation acoustique est une force volumique résultant d'un transfert de quantité de mouvement du faisceau ultrasonore vers le milieu dans lequel il se propage (Torr 1984). Ce transfert a lieu lorsque le faisceau rencontre une interface, ou lorsqu'il se propage dans un milieu absorbant tel que les tissus cérébraux. L'intensité de cette force étant proportionnelle à l'intensité acoustique, son effet est largement augmenté lorsque l'on focalise les ultrasons. Dans ces conditions on peut induire des déplacements des tissus de l'ordre de quelques microns. Ces déplacements étant notamment fonction des propriétés viscoélastiques, la force de radiation acoustique a initialement été utilisée pour réaliser des images échographiques d'élasticité des tissus (Bercoff et al. 2004; Sarvazyan et al. 1998). L'utilisation de l'IRM pour imager le mouvement a trouvé une de ses

premières applications dans l'élastographie par IRM, technique dans laquelle on image les mouvements des tissus provoqués par un vibreur extérieur au corps (Muthupillai et al. 1995). L'idée d'imager par IRM les mouvements induits par la force de radiation acoustique (Magnetic Resonance Acoustic Radiation Force Imaging ou MR-ARFI) a quant à elle été présentée par McDannold en 2008 (McDannold & Maier 2008), puis appliquée *in vivo* pour la première fois en 2010 (B Larrat et al. 2010a), dans le cerveau de rongeurs.

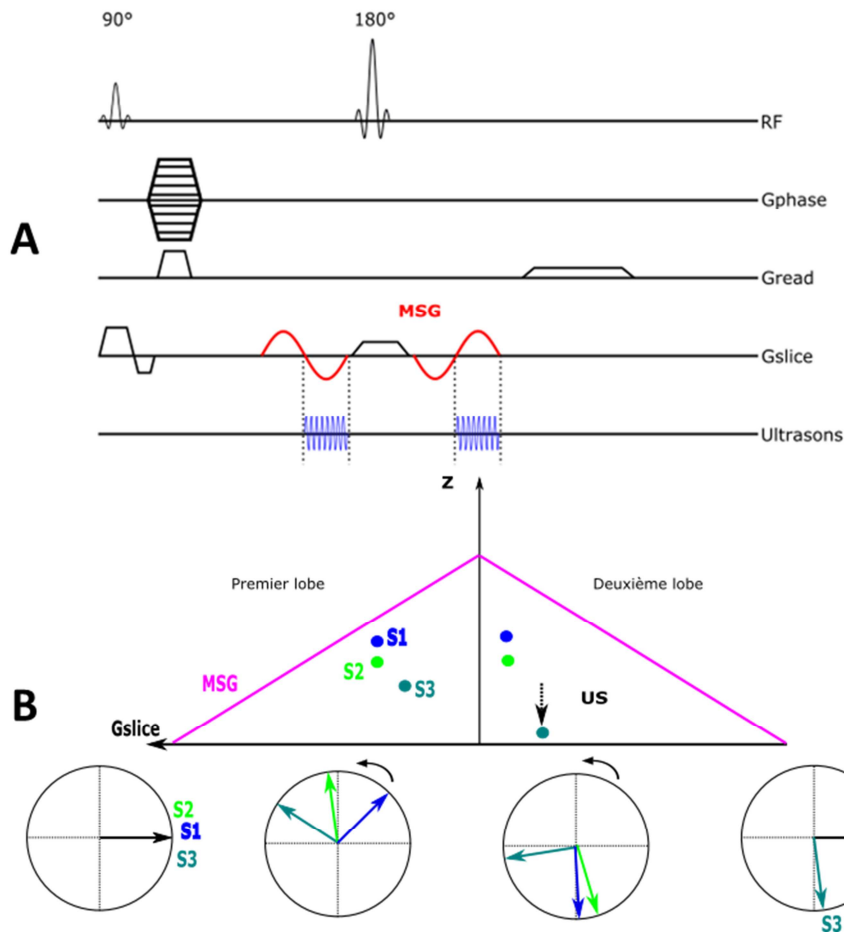


Figure I-12 : A. Chronogramme de la séquence ARFI utilisée. B. Principe de l'encodage du mouvement dans la phase de l'image ARFI.

Nous avons utilisé la séquence développée par Benoit Larrat en 2010 (B Larrat et al. 2010a)(Benoît Larrat et al. 2010). Elle est dérivée d'une séquence d'écho de spin multicoupes (MSME pour « Multi Slice Multi Echo »), à laquelle ont été ajoutés des gradients d'encodage de mouvement (MSG pour « Motion Sensitizing Gradients ») qui permettent de rendre la phase des spins sensible aux mouvements dans la direction de l'application de ces gradients. Le chronogramme de cette séquence est rappelé sur la figure I-12. Le déplacement des tissus étant maximum dans la direction de propagation des ultrasons, les MSG sont appliqués parallèlement au faisceau, ce qui correspond pour cette séquence à la direction de sélection de coupe. Les coupes d'imagerie seront donc orthogonales à la direction des ultrasons. Les MSG sont constitués de deux lobes consécutifs identiques mais de polarités opposées, qui peuvent prendre plusieurs formes (trapézoïdaux, rectangulaires, ...). Une forme sinusoïdale a été retenue (moindre sollicitation des gradients et

moindres courants de Foucault). Nous rappelons ici brièvement le principe selon lequel les MSG permettent de rendre la phase de l'image sensible au mouvement des spins.

On suppose les gradients d'encodage de mouvement appliqués dans la direction Z, et croissants selon cet axe lorsqu'ils sont positifs (respectivement décroissants lorsqu'ils sont négatifs). Prenons deux spins S_1 et S_2 ayant pour coordonnées Z_1 et Z_2 selon l'axe Z tels que $Z_1 < Z_2$. Observons d'abord le comportement de ces spins lorsqu'ils sont immobiles. Lors de l'application du premier lobe de MSG, que l'on considérera positif, S_2 va accélérer par rapport à S_1 car il va connaître un champ magnétique total plus important. Lors de l'application du deuxième lobe, identique au premier mais de signe opposé, S_1 aura maintenant une vitesse de précessions plus importante que son voisin et va donc rattraper son retard par rapport à S_2 , ils seront en phase à la fin de l'application du MSG.

Considérons maintenant le cas où S_1 est immobile mais que S_2 se déplace selon l'axe Z lors de l'application du deuxième lobe de gradient. Comme précédemment, lors du premier lobe de gradient, S_2 va précesser plus vite et prendre de l'avance par rapport à S_1 . Lors de l'application du deuxième lobe, S_2 bouge à une position Z_3 telle que $Z_3 > Z_2$. Le champ total y étant plus faible qu'en Z_2 , la vitesse de précession de S_2 sera diminuée, il va donc perdre son avance sur S_1 et même prendre du retard sur ce dernier. A la fin de l'application des MSG, les deux spins seront donc déphasés. On pourra observer ce déphasage accumulé par les spins en mouvement sur les images de phase comme le montre la figure I-13.

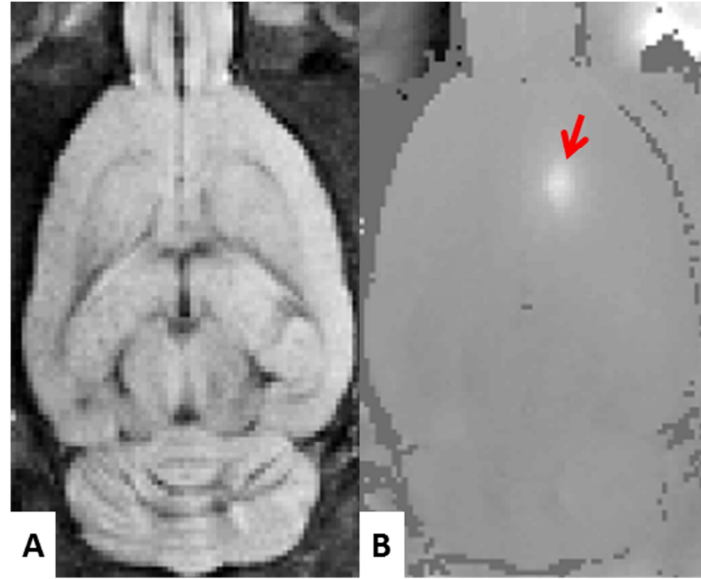


Figure I-13 : Images ARFI. A. Image de magnitude. B. Image de phase correspondante après déroulage de la phase. La flèche rouge indique la position de la tache focale ultrasonore, qui se traduit par une phase plus importante (hyper signal) du fait du mouvement des tissus lors de l'application des ultrasons.

Les tirs ultrasonores sont synchronisés sur la séquence IRM de façon à intervenir sur le deuxième lobe des gradients d'encodage. La variation de phase $\Delta\phi$ induite par le déplacement des tissus se calcule suivant l'équation suivante (Larrat 2010) :

$$\Delta\phi(\vec{r}) = 2\gamma \int_0^T \vec{G}(t) \cdot \vec{u}(\vec{r}, t) dt \quad (I.5)$$

Où γ est le rapport gyromagnétique du proton, G le gradient durant une période T d'encodage sinusoïdal, et u le déplacement induit par la force de radiation.

Nous avons choisi d'appliquer deux MSG par TR, un avant le pulse 180° et un après. Les deux MSG étant symétriques, les déphasages vont s'accumuler ce qui doublera l'encodage de mouvement réalisé.

Pour obtenir un encodage plus important, on peut également choisir d'augmenter la durée des gradients. Cependant, en augmentant la durée des MSG, on augmente le TE ce qui va résulter en une perte de signal. Nous avons trouvé un compromis en choisissant une durée de 4 ms par lobe. Afin de maximiser l'encodage, nous avons choisi de tirer les ultrasons pendant toute la durée du deuxième lobe de MSG, soit 4 ms.

Enfin pour augmenter le déphasage induit par le mouvement, on peut également utiliser des gradients plus forts. La première limitation est d'ordre matériel, puisque la valeur maximum est contrainte par le tunnel de gradient dont on dispose (ici 760 mT.m^{-1}). D'autre part, augmenter la valeur de ces gradients va entraîner des vibrations importantes, qui peuvent résulter en l'apparition d'artefacts de mouvement sur les images. Il est donc nécessaire de chercher à diminuer les mouvements du lit lors de ces acquisitions. Dans notre cas nous avons dû brider les gradients à 450 mT.m^{-1} .

Finalement, on peut montrer que la variation de phase induite par le déplacement des tissus est proportionnelle au carré de la pression acoustique (B Larrat et al. 2010a). En notant φ la phase mesurée lors de l'application des ultrasons, φ_{ref} la phase de référence que l'on acquiert en l'absence d'ultrason et P_{ac} la pression acoustique, on aura alors :

$$P_{\text{ac}} = A * \sqrt{\varphi - \varphi_{\text{ref}}} \quad (1.6)$$

Où A est le facteur de proportionnalité. Ainsi, on peut estimer la pression acoustique *in situ* afin de prévoir et de contrôler plus précisément la procédure de perméabilisation.

I-4.5. Mise en évidence et quantification de la perméabilisation : utilisation des agents de contraste IRM

Afin de mettre en évidence la perméabilisation de la BHE, il est possible d'utiliser des agents moléculaires ne passant pas cette barrière à l'état basal, et visibles en IRM : les agents de contraste IRM. On distingue deux grandes catégories: les agents paramagnétiques, qui sont les plus largement utilisés en IRM, et les agents superparamagnétiques. Durant cette thèse, nous avons uniquement travaillé avec des agents paramagnétiques, ce sont donc eux que nous présenterons dans ce paragraphe. Nous rappelons brièvement leur principe d'action, puis nous verrons comment ils peuvent être visualisés et même quantifiés en utilisant des séquences de relaxométrie.

I-5.4.a) Les agents de contraste paramagnétiques

Le paramagnétisme désigne la capacité de certains noyaux à acquérir une forte aimantation lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique extérieur. Cette propriété est expliquée par la présence d'électrons non appariés sur les couches électroniques externes de ces atomes, ce qui, sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, entraîne l'apparition d'un moment magnétique

électronique dont la valeur est beaucoup plus élevée que celle du moment magnétique de spin des protons.

L'ion gadolinium(III) (Gd^{3+}) possède 7 électrons non appariés, ce qui lui confère un spin électronique de 7/2 et donc une grande efficacité, faisant de lui un bon candidat en tant qu'agent de contraste. D'autres ions paramagnétiques sont parfois utilisés, notamment le manganèse(II) (Mn^{2+}), néanmoins le Gd^{3+} est de loin l'agent de contraste le plus courant en IRM. Durant cette thèse, nous avons utilisé uniquement des chélates de Gd^{3+} . En présence de Gd, il va se créer une interaction dipolaire entre son moment magnétique électronique, et les moments magnétiques de spin des protons environnants. Le résultat sera une diminution des temps de relaxation T_1 et T_2 en présence de l'ion paramagnétique. Ainsi, contrairement à d'autres modalités d'imagerie utilisant des agents de contraste, telles que les microbulles en échographie ou les traceurs pour la tomographie par émission de positons (TEP), on n'observera pas en IRM le signal provenant directement de l'agent, mais plutôt la modification du signal des spins avoisinant l'agent de contraste.

Selon la théorie développée par Solomon-Bloembergen-Morgan (Bloembergen 1957; Solomon 1955; Bloembergen et al. 1948), les temps de relaxation effectifs $T_{i,(i=1,2)}$ en présence d'un agent de contraste peuvent être décrits par la somme d'un terme diamagnétique correspondant au temps de relaxation en l'absence du composé paramagnétique, et d'un terme paramagnétique décrivant l'influence de l'agent de contraste :

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}} \quad (1.7)$$

Il a également été montré en 1962 par Swift et Connick (Swift & Connick 1962) que le terme paramagnétique était proportionnel à la concentration $[Gd]$ de l'agent de contraste selon la relation :

$$\frac{1}{T_{i,p}} = r_i [Gd] \quad (1.8)$$

La constante de proportionnalité r_1 (respectivement r_2) est appelée relaxivité longitudinale (respectivement transversale) et s'exprime généralement en $mM^{-1}.s^{-1}$. La relation (1.8) peut être mise à profit pour calculer la concentration en agent de contraste grâce à une mesure du T_i . En effet, par l'acquisition d'une carte paramétrique T_i en l'absence d'agent de contraste on peut connaître la valeur du terme diamagnétique. Si l'on acquiert ensuite cette même carte en présence d'agent paramagnétique on connaîtra le T_i effectif, à partir duquel on pourra calculer la valeur du terme paramagnétique et donc la concentration en agent de contraste si on connaît sa relaxivité. Lorsque cette concentration est faible (de l'ordre de 1 mM), l'effet T_2 est négligeable par rapport à l'effet T_1 . Ainsi, pour les doses injectées en clinique comme en préclinique, les agents paramagnétiques ont majoritairement un effet T_1 et seront utilisés comme tels.

Les agents de contraste étant injectés dans l'organisme, ils doivent également ne présenter aucune toxicité. L'ion Gd^{3+} , bien que très bon agent de contraste, a le désavantage d'être extrêmement toxique sous sa forme libre. Son rayon étant très proche de celui du calcium, il a été montré qu'il pouvait bloquer les canaux calciques (Biagi & Enyeart 1990), ce qui peut affecter des fonctions particulièrement critiques telles que la neurotransmission ou la contractilité myocardique. Par ailleurs, un lien a été établi entre l'injection de Gd^{3+} et des cas de fibrose néphrogénique systémique, en particulier chez des patients insuffisants rénaux chroniques (Kuo et al. 2007).

Afin de rendre les ions Gd^{3+} biocompatibles, il est donc nécessaire de les chélater à l'aide de ligands organiques pour former des complexes non toxiques, dont la figure I-14 présente quelques exemples. Les chélates doivent respecter la condition d'une liaison extrêmement stable entre le Gd et le ligand, afin d'éviter tout relargage de l'ion dans l'organisme. Pour ce faire, les composés utilisés sont généralement des polyaminocarboxylates. Outre leur fonction de biocompatibilité, la forme des chélates va également déterminer la biodistribution et la pharmacocinétique de l'agent de contraste. Ces données vont notamment décrire la capacité d'un agent de contraste à accéder à sa cible, la durée d'interaction entre le chélate et les molécules d'eau d'un tissu d'intérêt et enfin le temps nécessaire à son élimination.

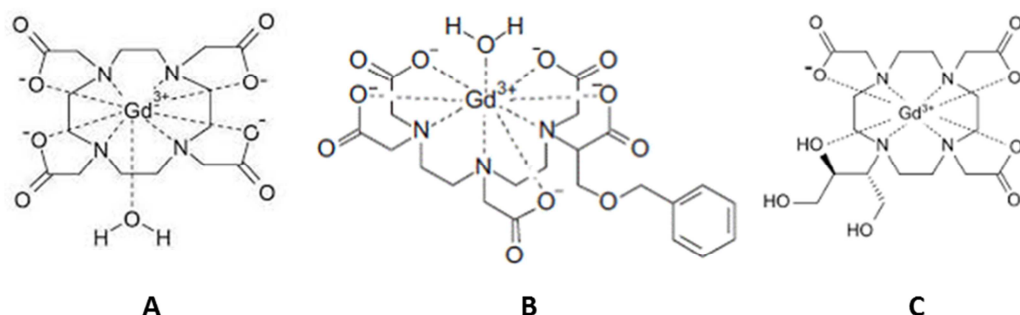


Figure I-14 Structure d'agents de contraste IRM commerciaux à base de Gadolinium. A. Dotarem®(Guerbet, France). B. MultiHance®(Bracco, Italie). C. Gadovist®(Bayer, Allemagne).

Enfin, notamment à cause de leur caractère hydrophile, ces agents de contraste paramagnétiques ne passent pas la BHE à l'état basal. En revanche, du fait de leur taille réduite, ils peuvent diffuser à travers une BHE altérée ou transitoirement perméabilisée. Cette propriété est généralement mise à profit afin de rehausser le contraste lors du diagnostic de certaines tumeurs cérébrales, mais peut également être utilisée afin de mettre en évidence *in vivo* une perméabilisation transitoire de la BHE suite à l'application d'ultrasons.

I-5.4.b) Voir et quantifier les agents de contraste IRM

Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, les agents de contraste paramagnétiques sont principalement utilisés pour leur effet sur le temps de relaxation longitudinal, ce qui induit un hypersignal sur des images pondérées T_1 . On peut notamment observer sur la figure I-15 un rehaussement de contraste local dû à la pénétration d'agents de contraste dans les tissus cérébraux suite à une perméabilisation de la BHE par ultrasons.

Cependant, l'information apportée par les images pondérées T_1 est uniquement qualitative et ne renseigne pas sur la dose d'agent de contraste délivrée à un organe cible. Afin d'obtenir des informations quantitatives, on peut néanmoins exploiter la relation de proportionnalité entre la concentration en Gd et la modification du T_1 que nous avons décrite au paragraphe 5.3.1. A partir de l'acquisition de cartes paramétriques du temps de relaxation longitudinal, on pourra calculer la concentration absolue en agent de contraste *in vitro* et *in vivo*.

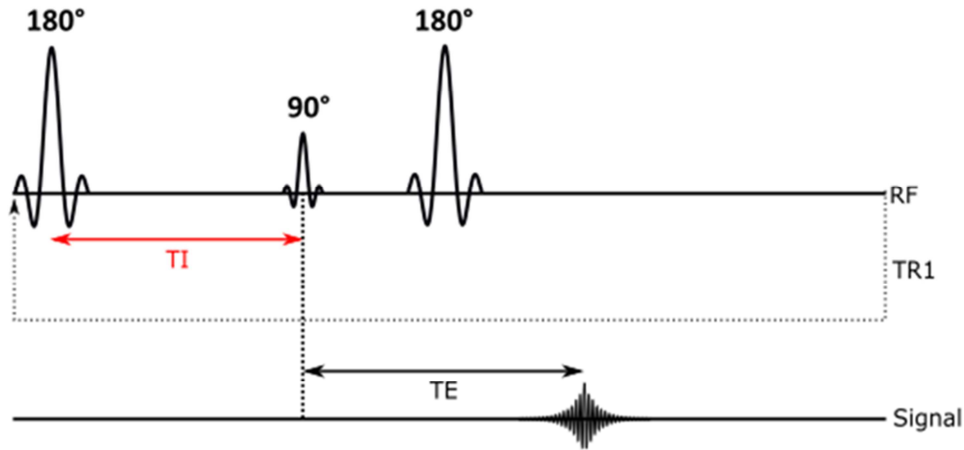


Figure I-15 : Chronogramme d'une séquence d'inversion récupération. Un premier pulse 180° permet d'inverser l'aimantation longitudinale. On laisse alors repousser cette aimantation durant un temps TI auquel le signal est mesuré grâce à une séquence d'écho de spin. Ce schéma est alors répété pour différentes valeurs de TI afin de reconstruire la courbe de repousse de l'aimantation longitudinale.

La méthode la plus courante permettant de mesurer le T_1 est l'inversion-récupération, proposée par Vold en 1968 (Vold 1968). Il s'agit dans un premier d'appliquer un pulse 180° au temps $t=0$ afin d'inverser l'aimantation. L'aimantation longitudinale vaut alors $M_z(0) = -M_0$, où M_0 représente sa valeur à l'équilibre, et sa composante transversale est nulle. On laisse alors l'aimantation longitudinale repousser durant un temps TI (temps d'inversion) à l'issue duquel une séquence de type écho de spin est appliquée. Le chronogramme est rappelé sur la figure I-16. Juste avant l'application du pulse 90° de la séquence écho de spin, la valeur de l'aimantation longitudinale est donnée par :

$$M_z(TI) = M_0 \left[1 - 2 \exp\left(-\frac{TI}{T_1}\right) \right] \quad (I.9)$$

A l'issue de l'écho de spin, c'est-à-dire au moment de l'enregistrement du signal, la valeur de l'aimantation transverse vaudra alors :

$$M_{xy}(TI + TE) = M_0 \left[1 - 2 \exp\left(-\frac{TI}{T_1}\right) \right] \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (I.10)$$

Ainsi, en répétant cette mesure pour différents TI, on peut reconstruire la courbe de récupération de l'aimantation longitudinale (figure I-16), puis ajuster cette courbe avec l'équation (I.10) afin d'obtenir la valeur de T_1 . Le chronogramme est rappelé sur la figure I-15. Afin que ce calcul soit juste, il est nécessaire de laisser l'aimantation longitudinale repousser entièrement durant un temps TR_1 avant de réaliser une nouvelle inversion, le délai typique étant de cinq fois T_1 pour récupérer 99 % de l'aimantation. A 7 T, les T_1 des tissus varient de 1200 ms pour la matière blanche à 2100 ms pour la matière grise (Rooney et al. 2007), ce qui nécessite un délai TR_1 de l'ordre de 10 s entre chaque inversion. D'autre part, cette méthode ne permet d'encoder qu'un pas de phase par inversion. Prenons alors l'exemple d'une carte paramétrique constituée de 10 coupes de chacune 128 x 128 voxels, ce qui représente des valeurs standard pour l'imagerie *in vivo*. Si l'on considère que 10 TI sont suffisants pour reconstruire correctement la courbe de repousse de l'aimantation, et en

prenant un TR_1 de 9 s, il faudra alors plus de 32 heures pour acquérir l'ensemble de la carte, ce qui n'est évidemment pas envisageable *in vivo*.

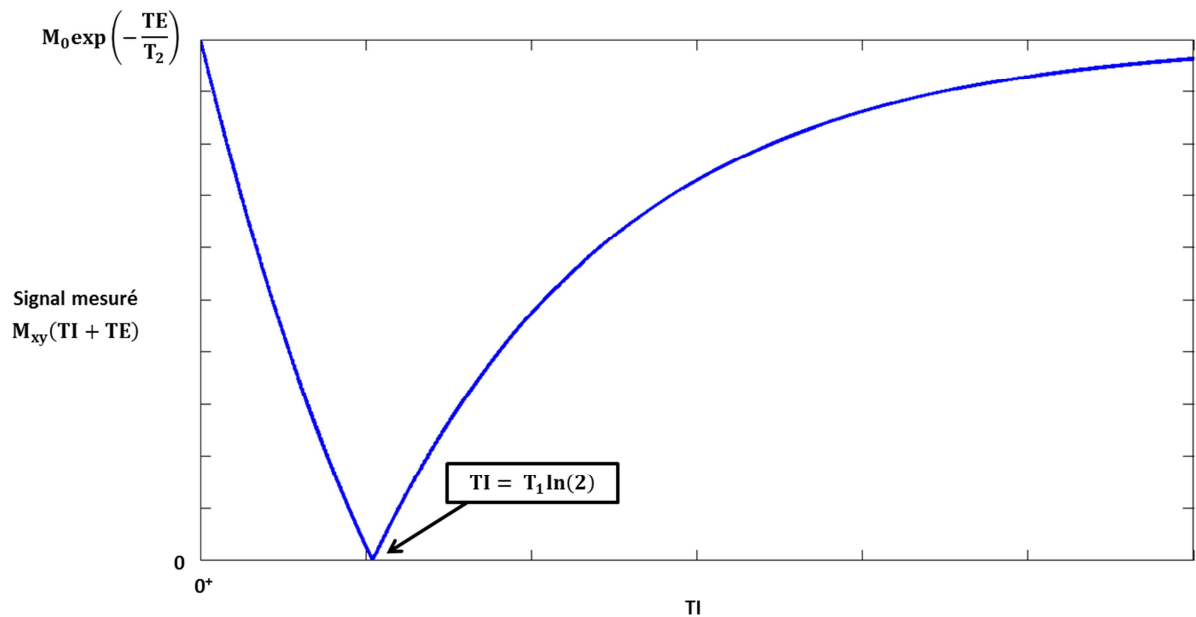


Figure I-16 : Signal mesuré en fonction du TI pour une séquence d'inversion récupération. Le signal passe par zéro à $TI = T_1 \ln(2)$.

De nombreuses études ont alors cherché à accélérer la mesure de T_1 afin qu'elle puisse être réalisée en des temps compatibles avec une application clinique. L'une des méthodes les plus utilisées est basée sur les travaux de Look et Locker en 1968 (Look & Locker 1968), dont l'approche permet de reconstruire intégralement la courbe de récupération de l'aimantation après une seule et unique inversion. La séquence que nous avons utilisée afin de réaliser les cartes paramétriques de T_1 a été introduite par Deichmann (Deichmann & Haase 1992) et implémentée à Neurospin par Benjamin Marty (Marty et al. 2012) lors de sa thèse et s'inspire de cette méthode. Nous en rappelons ici les principes.

Tout comme une séquence d'inversion-récupération classique, il va s'agir de reconstruire la courbe de repousse de l'aimantation longitudinale. La première étape consiste donc toujours en l'inversion de cette aimantation grâce à un pulse 180° . Cependant, ce ne sera plus un pulse de 90° qui permettra de basculer l'aimantation dans le plan transverse mais un angle de bascule α faible (inférieur à 10°), suivi d'une séquence d'écho de gradient permettant de mesurer le signal. Cet angle de bascule étant faible, seule une petite partie de l'aimantation longitudinale est basculée dans le plan transverse et sa repousse est donc peu perturbée. La séquence d'écho de gradient étant rapide, on va pouvoir répéter cette mesure plusieurs fois durant la repousse de l'aimantation, ce qui permettra de reconstruire la courbe de récupération complète avec une seule inversion (figure I-17).

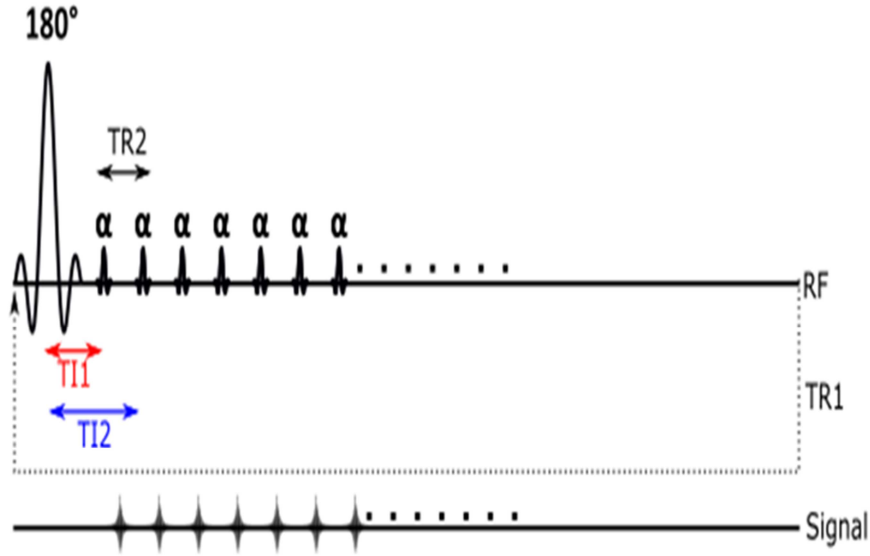


Figure I-17 : Chronogramme d'une séquence de type Look-Locker. Un pulse 180° permet d'inverser l'aimantation longitudinale. Des pulse d'angle α suivi d'une séquence d'écho de gradient permettent des mesures de l'aimantation à différents TI, et ainsi de reconstruire la courbe de repousse complète après une seule inversion.

Bien que peu perturbée par l'application répétée de pulse α , la repousse de l'aimantation ne suit plus précisément l'équation (I.8), ce qui doit être pris en compte dans l'estimation de T_1 . Deichmann et Haase ont montré en 1992 (Deichmann & Haase 1992) que la courbe de relaxation de M_z suivant son inversion dans le cadre d'une séquence de type Look-Locker pouvait être ajustée par le modèle suivant :

$$M_z(t) = A - B \exp\left(-\frac{t}{T_1^*}\right) \quad (I.11)$$

où T_1^* est un temps de relaxation effectif prenant en compte la perturbation de l'aimantation induite par la succession d'angles de bascule α . A, B et T_1^* sont donnés par :

$$A = M_0 T_1^*/T_1, B = M_0(1 + T_1^*/T_1), T_1^* = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{TR_2} \ln[\cos(\alpha)]\right)^{-1}$$

M_0 étant la valeur de M_z à l'équilibre et TR_2 le délai entre l'application de deux pulse α successifs. Notons que l'équation (I.11) n'est valable que dans l'hypothèse $TR_2 \ll T_1$ et $TR_2 \ll T_1^*$. Après avoir ajusté cette courbe, la valeur de T_1 est alors calculée selon :

$$T_1 = T_1^* \left(\frac{B}{A} - 1\right) \quad (I.12)$$

Le choix de l'angle de bascule α revêt une grande importance pour pouvoir estimer précisément T_1 . Une valeur trop importante entraîne une diminution de T_1^* ce qui peut avoir plusieurs conséquences. Dans un premier temps, lorsque T_1^* est raccourci, la courbe de relaxation atteint rapidement un plateau (voir figure I-18), ce qui limite le nombre de points que l'on peut

acquérir pour ajuster la repousse. Dans un deuxième temps, si la condition $TR_2 \ll T_1^*$ n'est plus respectée, on ne peut plus utiliser l'équation (I.11).

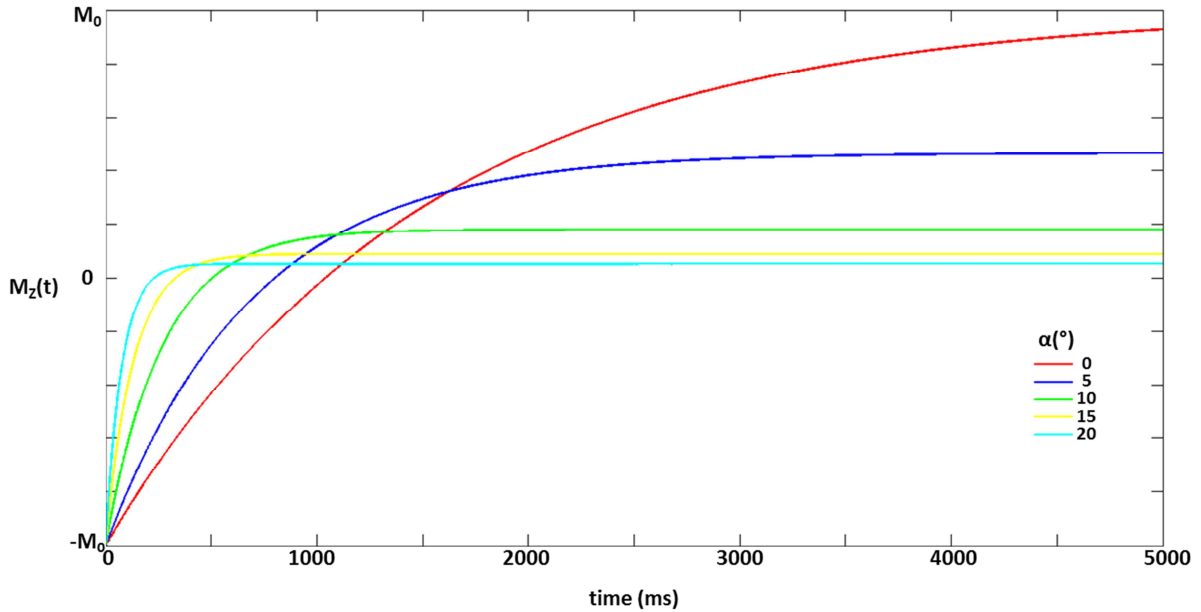


Figure I-18 : Simulations de la repousse de l'aimantation en fonction de l'angle α . Pour des valeurs trop élevées, un plateau est rapidement atteint, l'échantillonnage peut donc être insuffisant pour reconstruire convenablement la courbe de repousse.

Néanmoins, la proportion d'aimantation basculée dans le plan transverse, et donc la quantité de signal reçue, est proportionnelle au cosinus de l'angle α . Ainsi, il est nécessaire de garder un angle de bascule permettant d'enregistrer un signal suffisamment important afin de pouvoir estimer précisément T_1 . L'angle a été fixé dans notre cas à 5° .

De manière similaire à l'inversion-récupération classique, il est également nécessaire d'attendre la repousse complète de l'aimantation avant d'appliquer une nouvelle inversion. Or on n'encode toujours qu'un seul pas de phase par inversion. En reprenant une matrice de dimensions 128×128 dans le plan, avec 10 coupes d'imagerie, et un TR_1 de 9 s il faudra un peu plus de 3 heures pour acquérir cette carte. Ainsi, bien que cette méthode accélère notablement l'acquisition d'une carte paramétrique de T_1 , le temps nécessaire est encore trop important pour pouvoir être appliqué *in vivo*.

Afin d'accélérer encore l'acquisition, une méthode proposée par Deichmann et son équipe (Deichmann et al. 1999) consiste à segmenter l'espace de Fourier et acquérir la courbe de relaxation pour un nombre N de pas de phases suite à une même inversion. Il faut cependant veiller à respecter la condition $NTR_2 \ll T_1$ afin que l'équation (I.11) puisse encore être utilisée pour estimer T_1 .

Au cours de sa thèse, Benjamin Marty a réalisé des tests *in vitro* afin d'estimer le nombre maximum de pas de phase qu'il était possible d'encoder après une seule inversion tout en gardant une estimation précise du T_1 . Ses résultats ont montré que pour les valeurs des temps de relaxation longitudinaux des tissus cérébraux, le couple $N = 16$ et $TR_2 = 5$ ms permettait un bon compromis entre estimation précise et accélération de la séquence. Ainsi, en reprenant l'exemple de la matrice

précédemment définie, et en encodant $N = 16$ pas de phase par inversion, on obtient une carte paramétrique de T_1 en 12 minutes, ce qui est tout à fait compatible avec des applications *in vivo*.

I-5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons introduit le contexte de mon travail de thèse ainsi que les principales méthodes utilisées. Nous avons notamment rappelé le frein que représentait la BHE à la délivrance de médicaments dans le cerveau et en quoi l'utilisation des ultrasons pouvait permettre d'augmenter transitoirement sa perméabilité.

Nous avons également rappelé les principes de l'IRM et son intérêt pour le guidage des thérapies par ultrasons. Nous avons en particulier passé en revue les différents effets des ultrasons qui étaient visibles sur des images IRM, en exploitant l'imagerie de la phase. Enfin nous avons introduit les agents de contraste paramagnétiques et la façon dont ils pouvaient être quantifiés en utilisant des séquences particulières de cartographie paramétrique des temps de relaxation.

II. Développement d'un système motorisé d'ultrasons focalisés transcrâniens guidés par IRM pour le rongeur

Dans le précédent chapitre, nous avons présenté le principe de la perméabilisation de la BHE par ultrasons focalisés. Nous avons également vu que l'IRM était un outil de choix dans la planification et le suivi de la procédure, en permettant notamment de s'assurer de la localisation des ultrasons préalablement à la perméabilisation proprement dite. Néanmoins, en plus d'être capable de visualiser les ultrasons, il est évidemment intéressant de pouvoir choisir la zone à traiter c'est-à-dire la position de la tache focale.

La solution que nous avons retenue a été de pouvoir déplacer le transducteur ultrasonore à l'aide de moteurs compatibles IRM. L'objectif de ce chapitre est de présenter les développements technologiques, réalisés en collaboration avec les ingénieurs de la société Image Guided Therapy (IGT), qui m'ont permis d'aboutir à ce système. Dans un premier temps, nous rappelons les enjeux et les contraintes inhérents à la mise en place d'un tel système. Nous présentons ensuite la configuration adoptée pour la motorisation, puis le développement de lits interchangeables afin de pouvoir adapter le système à différentes applications. Une troisième partie porte sur la mise au point d'antennes IRM dédiées aux protocoles d'ultrasons sous IRM. Nous présentons ensuite la caractérisation des différents transducteurs conçus pour ce système et leur calibration en cuve. Enfin nous exposons des mesures de facteur de transmission des crânes de rat.

II-1. Enjeux, contraintes et cahier des charges

La réalisation d'un protocole d'ultrasons transcrâniens guidés par IRM nécessite *a minima* les éléments suivants:

- Un lit supportant le rongeur et disposant d'un dispositif de stéréotaxie permettant de maintenir l'animal.
- Un transducteur ultrasonore permettant la génération des ultrasons.
- Une antenne IRM permettant de réaliser les images, tout en n'entravant pas la propagation des ultrasons.

Ces différents éléments doivent en outre satisfaire à un certain nombre de contraintes :

- Compatibilité magnétique : absence de composants ferromagnétiques, limitation des courants de Foucault dans le cas de l'utilisation de matériaux conducteurs.
- Compatibilité RF pour les éléments actifs tels que le transducteur et son électronique, afin de ne pas perturber le signal IRM.
- Compacité suffisante du fait de l'espace restreint offert par le tunnel d'un scanner IRM, en particulier préclinique.

Le travail présenté dans ce chapitre est basé sur un système d'ultrasons transcrâniens guidés par IRM développé par Jean-François Aubry et Benoit Larrat au cours de sa thèse (Larrat 2010), puis ultérieurement modifié par Benjamin Marty (Marty 2012). Pour ce système, le choix a été fait de

positionner l'animal sur le ventre, en position physiologique, le transducteur étant placé au-dessus du crâne. Le lit est constitué d'un demi-cylindre de plexiglas, dans lequel est creusé un rail permettant la translation du transducteur dans l'axe du tunnel IRM. Le transducteur est relié à son support mobile par deux liaisons rotules, ce qui rajoute deux degrés de liberté et permet de le positionner correctement. Le lit intègre également un système de stéréotaxie constitué d'un mors, et de barres d'oreilles qui peuvent être placées en trois positions différentes pour s'adapter à la taille de l'animal. Trois transducteurs mono-élément compatibles IRM ont également été développés pour s'intégrer au système et ont été fabriqués par la société Imasonic (Voray-sur-l'Ognon, France):

- Deux transducteurs 1,5 MHz, de distance focale 20 mm, et de diamètre 25 mm ($F/D = 0,8$)
- Un transducteur 2,5 MHz, de distance focale 20 mm, et de diamètre 25 mm ($F/D = 0,8$)

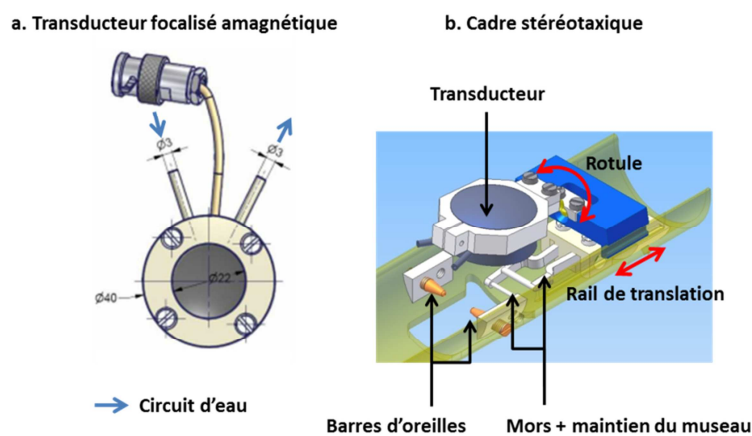


Figure II-1 : Dispositif d'ultrasons transcrâniens guidés par IRM existant au début de ma thèse(Marty 2012).

Concernant la réalisation d'images IRM, l'ensemble du dispositif a été étudié pour rentrer dans une antenne volumique corps entier de 6 cm de diamètre. Un schéma de ce système est présenté sur la figure II-1. Il a été utilisé avec succès au cours de plusieurs études (B Larrat et al. 2010b; Dervishi et al. 2013; Marty et al. 2012), mais ces dernières ont permis de mettre en évidence certains points d'amélioration de ce prototype:

- Le système de stéréotaxie ne présentant que trois positions de barres d'oreilles, les expériences sont restreintes à des animaux de poids limité (inférieur à 200-250 g).
- Le système de stéréotaxie étant intégré au lit, l'installation de l'animal se fait directement devant le scanner IRM, ce qui rend plus difficile les gestes délicats tels que la pose de cathéter. La non-modularité de la stéréotaxie empêche également d'utiliser le système pour des espèces différentes (souris notamment).
- L'utilisation de transducteurs mono-élément ne permet pas de choisir la profondeur de la tache focale. D'autre part, seules deux fréquences sont disponibles, ce qui ne permet pas des applications nécessitant des fréquences plus basses.
- La qualité d'imagerie pourrait être améliorée par l'utilisation d'une antenne plus proche du cerveau.

- Enfin, avec un tel système, le positionnement du transducteur se fait visuellement avant d'introduire l'animal dans l'aimant. La position de la tache focale est ensuite vérifiée *in situ* grâce à l'imagerie ARFI. Néanmoins, un mauvais positionnement implique de ressortir l'animal du scanner, puis de déplacer manuellement le transducteur pour cibler la région d'intérêt. Ce processus itératif peut s'avérer relativement long.

Afin de répondre au dernier point de positionnement de la tache focale, plusieurs solutions ont été proposées dans la littérature.

Prépositionnement manuel plus précis

Une équipe a mis au point une procédure de positionnement utilisant la réflexion des ultrasons sur une grille, permettant de raffiner le placement *a priori* du transducteur par rapport au crâne (Choi et al. 2007). Néanmoins, la position de la tache focale n'est dans ce cas pas confirmée *in situ* préalablement au traitement.

Utilisation de transducteurs multi-éléments

Pour des applications cliniques, on utilise généralement des transducteurs ultrasonores constitués de plusieurs éléments, et le déplacement de la tache focale est réalisé en choisissant judicieusement les phases des signaux envoyés à chacun des éléments (Pernot et al. 2003; Hynynen et al. 2004; Pulkkinen et al. 2014). Néanmoins, l'espace disponible dans le tunnel d'un aimant préclinique étant réduit (9 cm dans notre cas), les transducteurs utilisés pour des applications sur le petit animal sont généralement de dimensions moindres, rendant la conception de sonde multi-éléments plus compliquée. Par ailleurs, à nombre d'éléments fixé, la tache focale se déforme d'autant plus que le déplacement demandé est important. Ceci est d'autant plus vrai que le nombre d'éléments est faible, ce qui est généralement le cas sur des transducteurs multi-éléments de petite dimension. Ainsi, le volume d'intérêt que l'on peut couvrir sans observer de distorsion importante de la tache focale est limité.

Systèmes de positionnement compatibles IRM

Enfin des études ont présenté des solutions intégrant un système de positionnement compatible IRM, permettant ainsi de déplacer le transducteur à l'intérieur du scanner. Le déplacement du transducteur peut s'effectuer de façon manuelle (Liu et al. 2010; McDannold et al. 2011)(Aryal et al. 2013), ou bien à l'aide de moteurs (Chopra et al. 2009). Ainsi, la position de la tache focale peut aisément être modifiée lorsque l'animal est déjà dans le scanner IRM, ce qui représente à la fois un gain de temps et une meilleure reproductibilité. Les solutions présentées dans ces études comportent néanmoins deux points d'amélioration principaux :

- La majorité de ces systèmes opère dans des aimants cliniques à 3 T car ils sont trop encombrants pour aller ailleurs. Ainsi, ils ne permettent pas de bénéficier des avantages que représente l'utilisation des hauts champs magnétiques pour l'étude des rongeurs, en particulier le gain en résolution et en rapport signal sur bruit.
- La plupart de ces systèmes nécessite un placement de l'animal sur le dos, c'est-à-dire une position non physiologique.

Nous avons retenu cette dernière solution de positionnement compatible IRM, en l'adaptant pour la première fois à un IRM préclinique haut champ. Pour ce faire, nous avons choisi d'ajouter au dispositif existant un déplacement motorisé du transducteur.

Notre cahier des charges était donc le suivant pour le développement d'un nouveau dispositif HIFU transcranien rongeur guidé par IRM haut champ :

- Etre capable de déplacer le transducteur à l'intérieur du tunnel de l'IRM à l'aide de moteurs afin de pouvoir piloter l'ensemble du système depuis la salle de contrôle des aimants, et permettre ainsi un gain de temps dans la réalisation des expériences, tout en profitant des solutions de guidage apportées par l'IRM.
- Disposer d'un lit pouvant accueillir l'animal sur le ventre, qui intègre un système de stéréotaxie réglable pour assurer le maintien du rongeur et permettre de s'adapter à sa taille.
- Rendre ce lit amovible afin de faciliter l'installation de l'animal, et pouvoir développer des modèles adaptés à l'espèce étudiée.
- Intégrer une antenne RF adaptée à ce lit pour pouvoir réaliser les images IRM. Faire en sorte que cette antenne soit au plus près du cerveau de l'animal afin d'améliorer la qualité des images.
- Développer de nouveaux transducteurs compatibles avec le système, en particulier des transducteurs multi-éléments permettant de choisir la profondeur de focalisation, et des transducteurs plus basse fréquence pour les applications de neurostimulation.
- L'ensemble de ces éléments devait être compatible IRM, et rentrer dans le tunnel de 90 mm de diamètre de l'aimant préclinique 7 T (PharmaScan, Brüker, Allemagne) utilisé pour nos expériences (figure II-2).

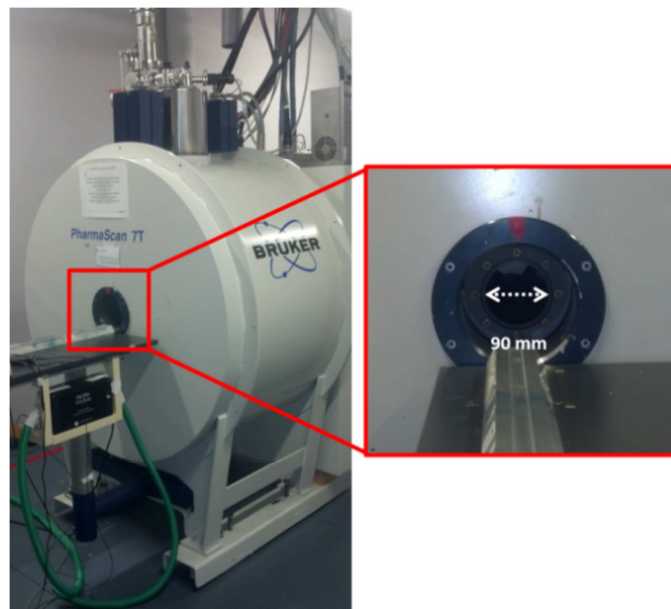


Figure II-2 : Aimant préclinique utilisé, et zoom sur le tunnel montrant l'espace restreint disponible.

Les réponses trouvées pour répondre à chacun de ces différents besoins sont exposées dans les paragraphes suivants.

II-2. Présentation de la motorisation

Le bloc moteurs, son électronique et son logiciel de pilotage ont été développés par IGT. J'ai participé ensuite aux tests et à sa validation.

Afin de respecter la condition de compatibilité magnétique, la motorisation du transducteur est réalisée par des moteurs piezoélectriques placés dans une cage de Faraday afin d'éviter l'émission d'ondes RF qui perturberaient l'acquisition des images IRM. Etant donné l'espace restreint disponible à l'intérieur du tunnel d'un IRM préclinique, et afin de maximiser la compatibilité électromagnétique, l'ensemble du bloc moteurs est placé à l'extérieur du scanner, et le mouvement des moteurs est transmis au support du transducteur par une tige en fibre de verre suffisamment longue pour atteindre le centre de l'aimant. Le bloc moteurs est également fixé solidairement à un berceau qui accueillera le lit (cf paragraphe II-3) et sera la partie pénétrant dans le tunnel de l'IRM. Le berceau est ajusté au tunnel de gradient afin de contraindre son mouvement et d'éviter ainsi les vibrations lors de l'acquisition d'images. Une vue d'ensemble du système est présentée sur la figure II-3.

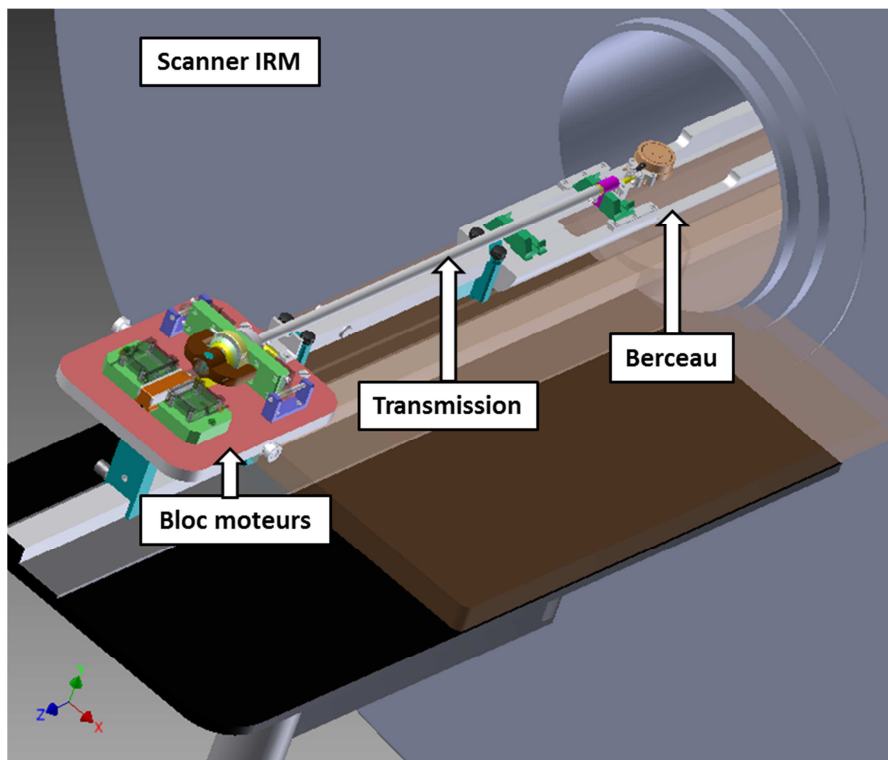


Figure II-3 : Représentation schématique en 3D de l'ensemble du système motorisé. Le bloc moteurs est situé à l'extérieur du scanner IRM. Il est solidaire du berceau qui supporte le lit et est introduit dans le tunnel de l'aimant. L'ensemble est en translation sur une glissière fixée au plateau présent devant l'IRM.

Le support mobile accueillant le transducteur est présenté sur la figure II-4. Il est constitué d'un plateau P guidé par des rails, formant une liaison de type glissière avec le berceau précédemment décrit et autorisant seulement une translation selon l'axe rostro-caudal (figure II4.B).

Sur ce plateau, un second élément mobile M est fixé par une liaison de type glissière autorisant une translation selon l'axe droite-gauche. Une crémaillère est vissée sur M (figure II-4.C). Enfin, le transducteur est relié à M par une double liaison rotule (figure II-4.D), permettant une plus grande liberté dans son positionnement.

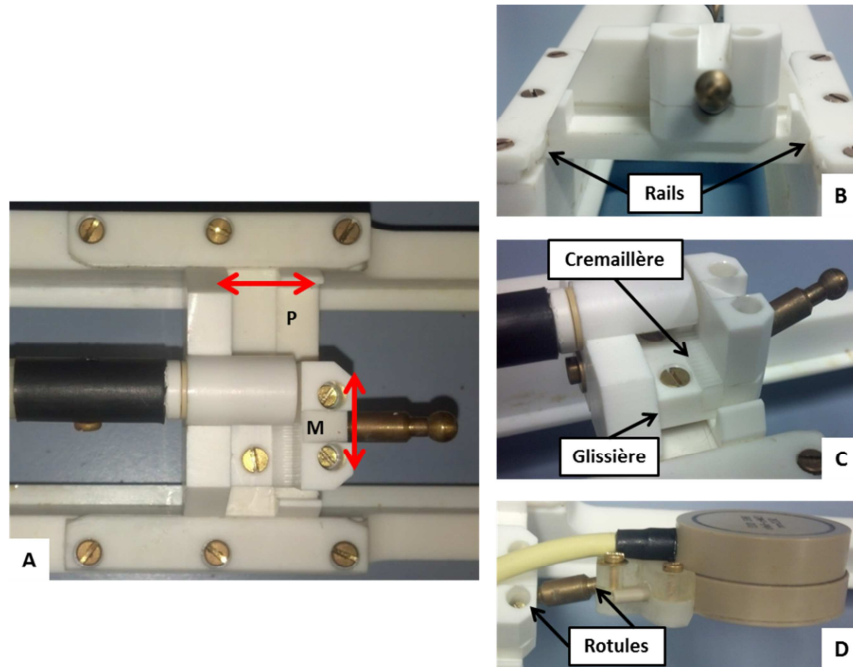


Figure II-4 : Support mobile du transducteur. A. Vue du dessus. Le plateau (P) permet une translation selon l'axe rostro-caudal guidée par des rails (B) fixés sur le berceau. Une deuxième pièce mobile (M) permet de convertir la rotation de la tige en translation selon l'axe droite/gauche grâce à une crémaillère (C). Le transducteur est relié à son support grâce à une double rotule (D).

Pour la translation dans l'axe rostro-caudal, la tige est reliée par une rotule à un pavé mobile dont deux faces opposées sont recouvertes de céramique (figure II-5.A et B). Deux moteurs identiques (HR4, Nanomotion, Yoqneam, Israel) sont disposés en vis-à-vis de ces bandes de céramiques, et induisent la translation du pavé grâce au mouvement de petits plots céramiques qui pressent les faces couvertes de céramique. Le pas minimal est de 0,005 mm tandis que la plage de déplacement totale est de 27 mm.

Concernant la translation suivant l'axe droite-gauche, un disque entouré d'une bande de céramique est serti autour de la tige de transmission (figure II-5.A et C). Deux moteurs identiques (HR2, Nanomotion, Yoqneam, Israel) sont fixés de part et d'autre de ce disque et entraînent sa rotation grâce au frottement induit par de petits plots en céramique. Cette rotation de la tige est ensuite convertie en translation grâce à un pignon et une crémaillère positionnés au niveau du bloc mobile de maintien du transducteur (figure II-4.C). Le pas minimal est de 0,0087 mm pour une plage de déplacement totale de 15 mm.

Pour chacun des axes de mouvement, la position des moteurs est connue en temps réel grâce à des encodeurs optiques.

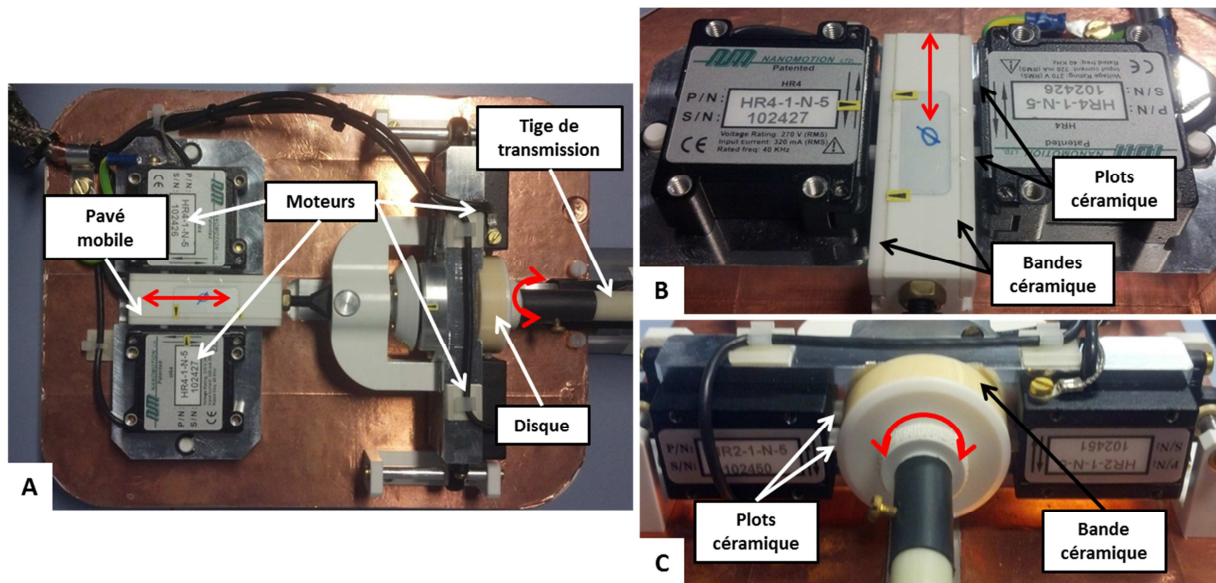


Figure II-5 : Composition du bloc moteurs. A. Vue du dessus. Le frottement de plots céramiques sur des bandes céramiques situées sur les cotés du pavé mobile entraîne sa translation dans l'axe tête pied (B). Un processus identique entraîne la rotation du disque (C). Les mouvements sont transmis au support du transducteur par la tige de transmission en fibre de verre.

L'ensemble du système est contrôlé à distance depuis la salle des consoles de l'IRM grâce au logiciel ThermoGuide® lui aussi développé par IGT (figure II-6). Il existe différentes options pour définir le déplacement du transducteur :

- Déplacement incrémental en choisissant l'amplitude du mouvement désirée.
- Déplacement selon une trajectoire mécanique prédéfinie. Chaque trajectoire est constituée de plusieurs segments, entrecoupés de changements de direction. Il est possible de coupler des tirs ultrasonores aux mouvements du transducteur. Les paramètres acoustiques peuvent être réglés indépendamment pour chacun des segments et changements de direction.

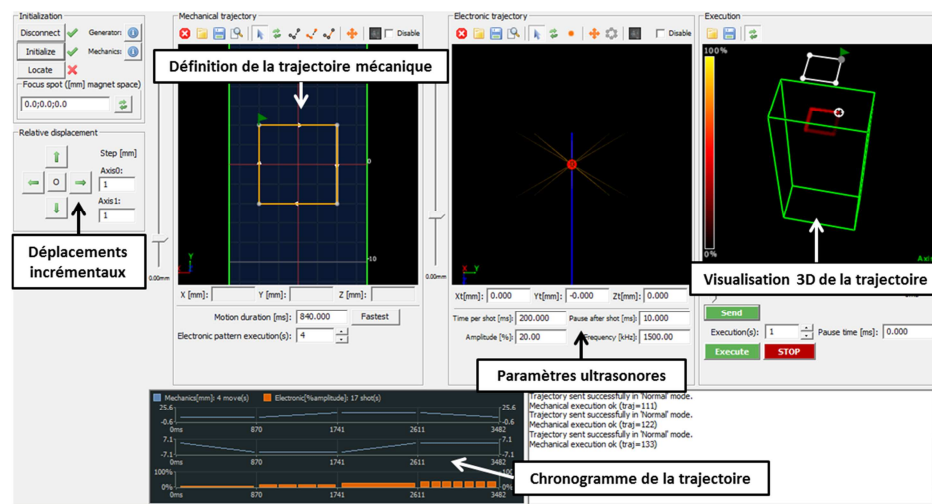


Figure II-6 : Interface de pilotage: ThermoGuide. Les mouvements du transducteur peuvent être réalisés de façon incrémentale pour le pré-positionnement. On peut également réaliser des trajectoires mécaniques combinées avec des tirs ultrasonores.

II-3. Développement d'un lit interchangeable

Le lit est l'élément de base qui va accueillir l'animal. J'ai participé à la conception et au dessin des différentes pièces mécaniques constituant le lit et le berceau en collaboration avec Fabien Rabusseau. L'intégralité de la fabrication a été prise en charge par IGT, et j'ai ensuite réalisé le test et la validation des différents prototypes. Sauf mention contraire, toutes les pièces sont constituées de polyéthylène téréphtalate (PETP). Les contraintes fixées pour la conception du lit étaient les suivantes :

- Etre correctement dimensionné pour les animaux à traiter, tout en répondant aux contraintes fixées par l'espace du tunnel IRM
- Pouvoir accueillir les dispositifs de suivi des fonctions vitales de l'animal (capteurs de température et de respiration) et disposer d'un système d'acheminement de l'anesthésie gazeuse.
- Ne pas gêner le mouvement des moteurs et permettre un déplacement du transducteur au-dessus du crâne de l'animal.
- Etre amovible pour faciliter l'installation de l'animal et les gestes délicats (pose de cathéter intraveineux pour la perméabilisation de la BHE notamment), et pouvoir développer des lits spécifiques à l'espèce étudiée.
- Disposer d'un système de stéréotaxie réglable pour s'adapter à la taille des animaux.
- Disposer d'une antenne radiofréquence (cf paragraphe II-4).

Comme nous l'avons présenté dans le paragraphe II-1, l'animal est positionné sur le ventre. En raison de la position du bloc moteurs devant l'entrée de l'aimant, nous avons choisi pour ce nouveau système d'orienter l'animal avec la tête vers l'avant du scanner IRM afin de garantir le mouvement du transducteur au-dessus du crâne du rongeur.

Afin de le rendre amovible, le lit a été conçu avec pour base une plaque rectangulaire plate sur laquelle sont fixées l'antenne RF, la stéréotaxie et l'arrivée de gaz anesthésiants. Ce lit s'imbrique dans le berceau présenté au paragraphe précédent. La solidarité mécanique entre le lit et le berceau est ainsi garantie ce qui empêche tout mouvement parasite, tout en permettant une mise en place ou un retrait du lit rapides.

Le système de stéréotaxie retenu est présenté sur la figure II-7, constitué d'un mors et de barres d'oreilles. Pour augmenter sa modularité par rapport au système existant, la position du mors peut être ajustée dans les trois directions. Le support du mors est percé de deux trous permettant d'accueillir des tuyaux pour l'acheminement de l'anesthésie gazeuse, et son aspiration si nécessaire. Eu égard aux contraintes de compacité, le système de barres d'oreilles a été intégré au support de l'antenne radiofréquence qui sera présentée au paragraphe suivant. Des écrous conçus spécialement pour cette application accueillent des barres d'oreille formées par des tiges de plastique filetées, et peuvent coulisser selon un axe rostro-caudal avant d'être fixés. Grâce à ce mécanisme, le choix de la position des barres d'oreilles n'est plus restreint à 3 positions discrètes, mais peut être ajusté précisément en fonction de la taille des animaux.

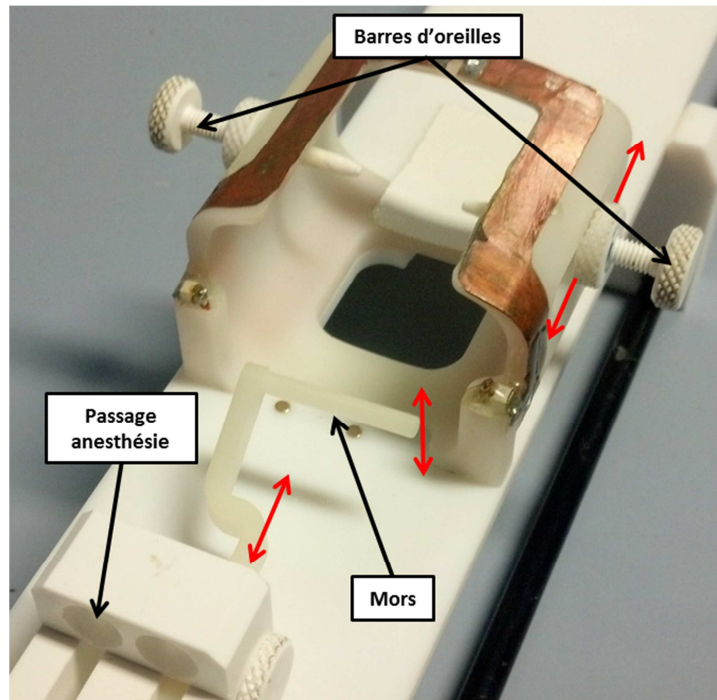


Figure II-7 : Système de stéréotaxie : La taille des barres d'oreilles peut être ajustée en les vissant, et leur position peut être modifiée en les translatant selon l'axe tête/pieds. Elles sont fixées grâce à un écrou spécialement conçu. L'avancée et la hauteur du mors peuvent également être ajustées. Enfin deux trous percés sur le support du mors permettent le passage des tuyaux d'anesthésie (entrée/sortie).

Enfin, une antenne radiofréquence et le circuit permettant de l'adapter sont intégrés au lit. Afin de pouvoir régler la résonance de l'antenne depuis l'extérieur de l'aimant, nous avons ajouté un système de tiges amovibles en fibre de verre suffisamment longues faisant office de tournevis. Le circuit comprenant des condensateurs variables est fixé sous le lit amovible (figure II-8). Des embouts femelles sont fixés sur la vis d'ajustement de ces condensateurs, et l'extrémité des tiges « tournevis » a été sculptée de façon à correspondre à l'empreinte de ces embouts femelles. Enfin, des guides percés sous le berceau (figure II-8.B) permettent de garantir l'alignement entre les embouts femelles et les tiges de réglage.

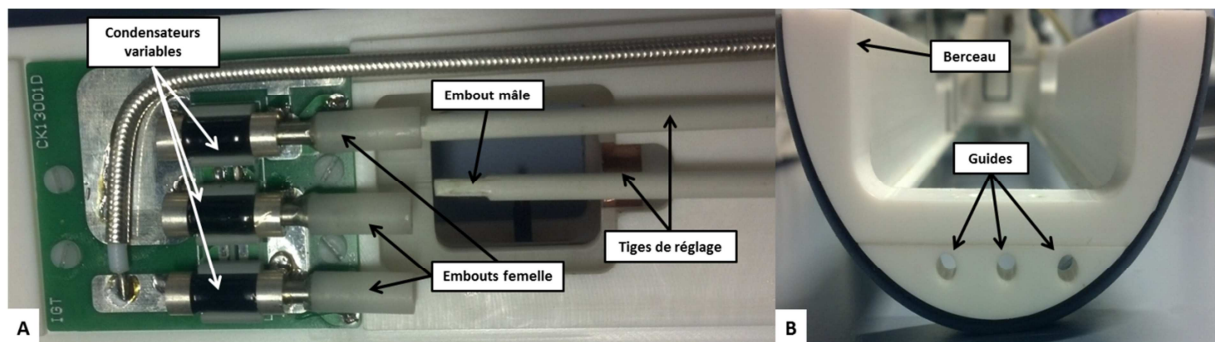


Figure II-8 : Accord des antennes à distance. A. Vue de dessous du lit présentant le circuit d'adaptation d'une antenne. Des tiges de réglage présentant un embout mâle permettent de régler les condensateurs variables munis d'embouts femelles depuis l'extérieur de l'aimant. Des trous percés dans le berceau guident les tiges pour permettre leur bon alignement (B).

II-4. Développement d'une antenne radiofréquence adaptée

Afin de pouvoir réaliser conjointement imagerie IRM et protocole d'ultrasons, il est nécessaire de disposer d'une antenne RF n'entravant pas la propagation des ultrasons, tout en fournissant un signal suffisant, et en ne gênant pas le déplacement du transducteur. Cette antenne doit également être adaptée au système de stéréotaxie précédemment présenté. L'ensemble des expériences ayant été réalisé à 7 T, l'antenne conçue devait présenter une fréquence de résonance de 300 MHz. Enfin, l'espace restreint (tunnel de gradient de 9 cm) imposait que le circuit d'adaptation soit le plus compact possible.

Afin de répondre à ces exigences, différentes géométries ont été envisagées. Pour chacune de ces géométries, j'ai réalisé avec l'aide de Michel Luong des simulations du champ magnétique rayonné afin d'estimer son homogénéité, puis j'ai fabriqué et testé les prototypes sur un fantôme d'eau. Les résonateurs construits l'ont été à partir de pistes de cuivres autocollantes de 5 mm de largeur découpées à la forme choisie puis collées sur un support en résine ABS, et tous les composants électroniques utilisés sont amagnétique et résistent aux hautes puissances transmises.

Pour évaluer les performances des antennes, nous avons acquis pour chacun des modèles une image pondérée T_2 d'un tube d'eau de 3 cm de diamètre placé au centre de l'antenne, en orientation axiale avec une séquence RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) présentant les paramètres suivants : $TE_{eff}/TR = 41/3800$ ms, matrice = $128 \times 128 \times 40$, résolution = $0,250 \times 0,250 \times 0,500$ mm³, facteur RARE = 8, et 4 moyennes (séquence II-1). Nous avons estimé l'homogénéité du signal en traçant les profils horizontaux et verticaux passant au centre de la coupe centrale pour chaque acquisition. Le rapport signal sur bruit (RSB) a également été calculé comme le rapport de la moyenne du signal dans une région d'intérêt (ROI) prise au sommet du tube d'eau, approximativement à la position désirée du cerveau du rongeur et de l'écart type du bruit estimé dans une région d'intérêt hors du tube d'eau (Bushberg, J. T. 2002).

Enfin des tests *in vivo* ont été effectués pour les modèles les plus satisfaisants en utilisant la même séquence. Nous présentons ici les différentes solutions envisagées.

II-4.1. Double boucles horizontales alimentées en parallèle

Pour cette première géométrie que nous nommerons antenne #1, nous nous sommes basés sur un modèle d'antenne dédié à des expériences d'ultrasons sous IRM conçue lors de la thèse de Benjamin Marty. Il s'agit de deux boucles ouvertes disposées horizontalement l'une au-dessus de l'autre et alimentée en parallèle (figure II-9.A). Cette géométrie garantit le passage des ultrasons de par sa forme ouverte sur le dessus, et le fait de ne pas fermer les boucles autorise le déplacement du transducteur au-dessus de l'antenne. Le circuit d'adaptation est constitué de trois condensateurs variables (figure II-9.D).

Les résultats de la simulation du champ B_1^+ sont présentés sur la figure II-9.A. On observe une inhomogénéité à la fois sur l'axe haut-bas (II-8.C), avec en particulier un champ relativement faible au centre de l'échantillon et plus fort en bas de l'antenne, mais également dans l'axe tête/pieds avec un champ émis plus important vers l'avant de l'antenne (figure II-9.B). On note aussi que le champ est particulièrement fort à proximité des pistes. Le cerveau du rongeur étant situé dans la partie

haute de l'antenne, nous avons néanmoins estimé au vu de ces simulations que le champ émis était suffisamment homogène pour nos applications.

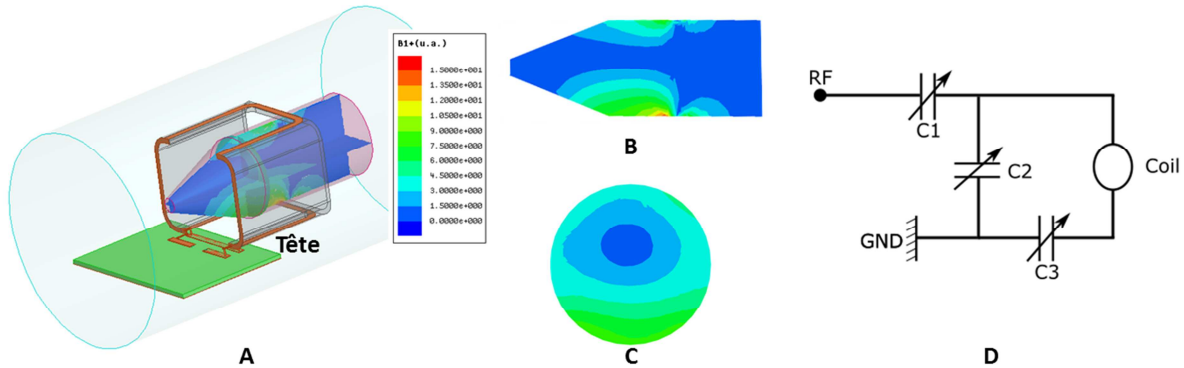


Figure II-9 : A. Modèle 3D et champ B_1^+ simulé de l'antenne #1. Coupes sagittale(B) et axiale (C) du champ simulé. D. Circuit d'adaptation correspondant.

La figure II-10 présente les résultats d'une acquisition RARE réalisée *in vitro* avec ce modèle d'antenne. On peut noter que les profils II-10.B et II-10.C sont plats sur l'échantillon, ce qui signifie que le champ émis par cette antenne est relativement homogène au sein d'une coupe. Nous avons obtenu dans ce cas une valeur de RSB de 800. Ces performances *in vitro* ont dans un premier temps été jugées satisfaisantes pour tester ce prototype *in vivo*.

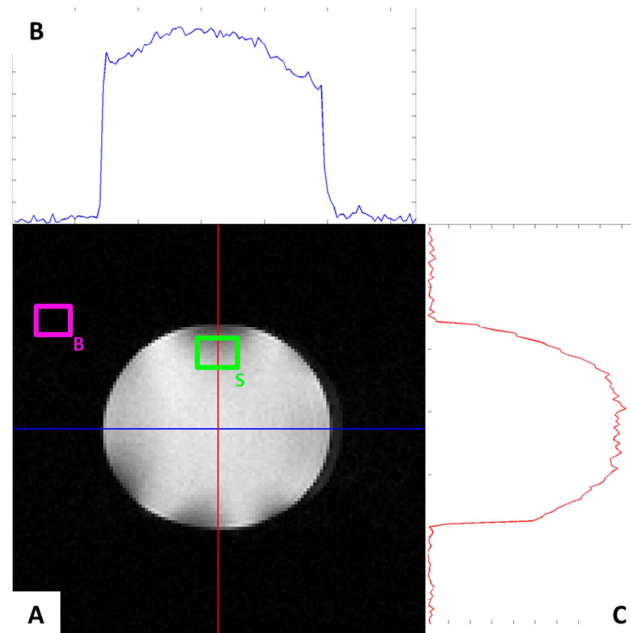


Figure II-10 : Image RARE d'un fantôme d'eau pour l'antenne #1. A. Coupe centrale, la courbe bleue (resp. rouge) représente la ligne selon laquelle a été réalisé le profil B (resp. C). En vert (resp rose) le ROI de calcul du signal (resp. du bruit).

La figure II-11 présente des images pondérées T_2 en orientations axiale (A) et coronale (B) obtenues avec cette antenne sur un rat Sprague-Dawley (180 g, Janvier, France) en utilisant la

séquence RARE II-1. On observe sur la coupe coronale que le signal est plus important à l'avant de l'animal. Les images en orientation axiale confirment cette observation avec un signal plus important sur la coupe la plus en avant du rat (encadré bleu). Enfin, on retrouve sur la coupe axiale la plus en arrière de l'animal (encadré rouge) un signal plus faible au centre de l'image qui correspond au centre de l'antenne. La géométrie en « U » des boucles, non fermées, pourrait expliquer ces hétérogénéités. En effet, le champ rayonné n'est pas parfaitement homogène et s'avère plus fort près des pistes. L'arrière du cerveau (encadré rouge) étant situé à proximité de la branche fermée du « U », il est possible que localement la puissance transmise corresponde à une bascule ou une refocalisation effectuées avec un angle trop élevé, résultant en une perte de signal.

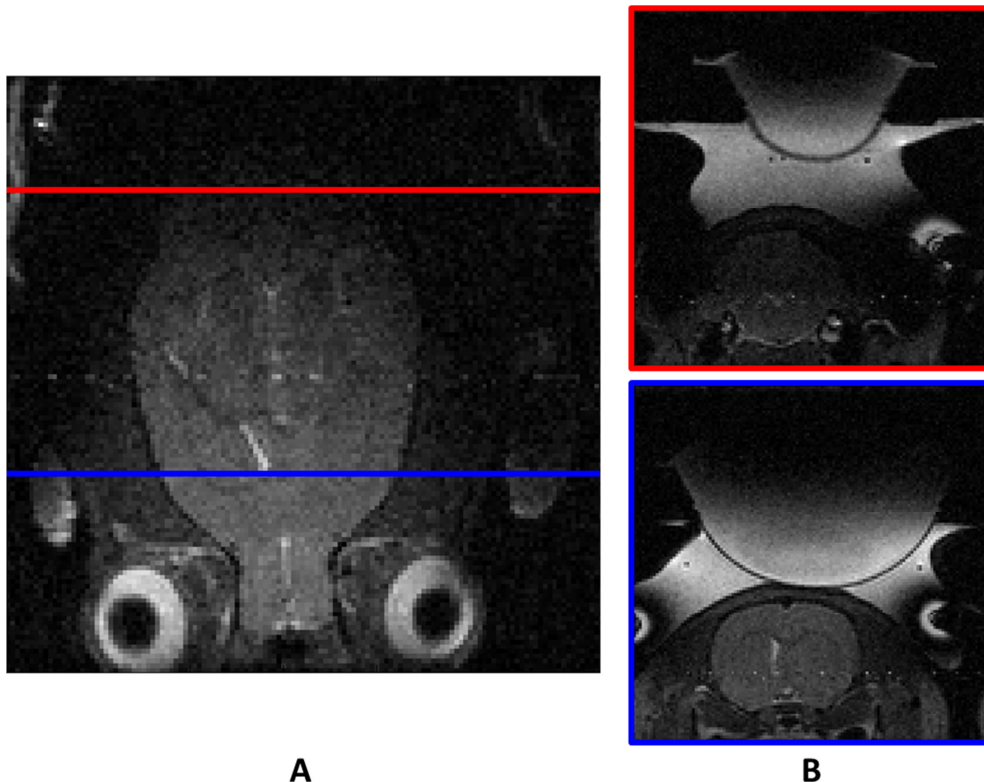


Figure II-11 : Images *in vivo* obtenues avec l'antenne #1. A. Coupe en orientation coronale. Les lignes colorées indiquent la position des coupes axiales (B). Le contraste est identique pour les trois images

Par ailleurs, ce modèle d'antenne s'est avéré instable. Nous avons rencontré une très grande difficulté à adapter l'impédance à 50 Ohms à l'aide des condensateurs variables, ainsi qu'une très grande sensibilité de cet accord vis-à-vis de son environnement. Les contraintes de compacité du système empêchent la mise en place d'un blindage, ce qui rend l'antenne sensible aux perturbations extérieures. Par ailleurs, l'accord de l'antenne était sensible à la configuration des câbles de transmission RF. L'explication la plus probable à ce phénomène est l'existence de courants de gaine dus à un déséquilibre entre les deux boucles qui ne sont pas parfaitement identiques. Nous avons envisagé l'ajout d'un filtre de type « balun » sur le câble coaxial de transmission pour éliminer ce courant, solution qui s'est avérée trop volumineuse pour notre système.

II-4.2. Doubles boucles verticales alimentées en parallèle

Afin de répondre aux problèmes présentés par l'antenne #1, une deuxième géométrie a été envisagée utilisant des boucles fermées alimentées en parallèle que nous nommerons antenne #2. Nous avons décidé de les disposer verticalement l'une face à l'autre (figure II-12.A) afin de maximiser l'espace disponible pour les déplacements du transducteur. Nous avons utilisé un circuit d'adaptation classique, avec un condensateur variable en série permettant l'adaptation et un condensateur en parallèle de l'antenne permettant son accord (figure II-12.D).

La simulation du champ B_1^+ présentée sur la figure II-12.A B et C montre une homogénéité satisfaisante au sein du résonateur, bien que le champ émis soit plus important à proximité des boucles.

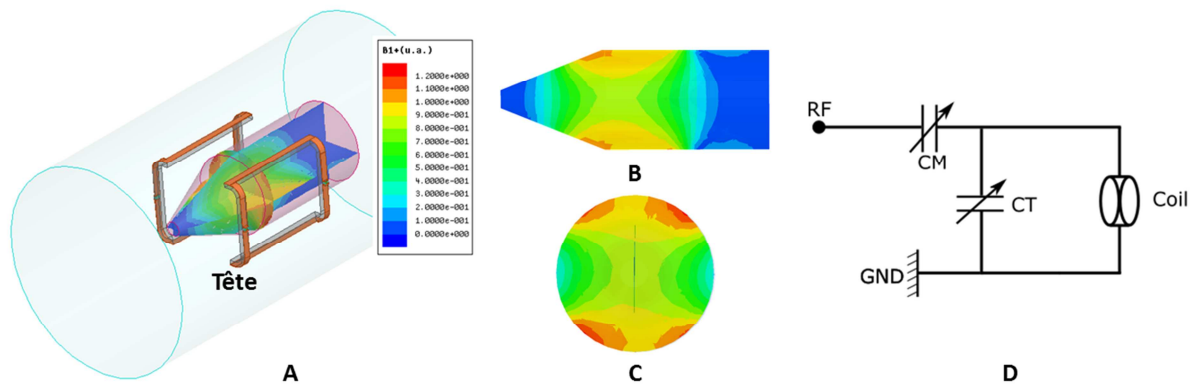


Figure II-12 : Modélisation de l'antenne #2. A. Modèle 3D et champ B_1^+ simulé de l'antenne #2. Coupes sagittale (B) et axiale (C) du champ simulé. D. Circuit d'adaptation correspondant.

La figure II--13 présente les résultats obtenus sur un fantôme d'eau avec cette antenne. La partie A représente l'image acquise avec un premier prototype, sur laquelle on observe une forte inhomogénéité dans la direction droite-gauche avec l'apparition d'une frange d'hyposignal sur la droite de l'image, ce qui est également visible sur le profil II-13.B. L'hypothèse avancée est un mauvais équilibrage des deux boucles (l'autocalibration des gains à l'émission par Bruker en début de séquence cherche à maximiser le signal total reçu dans le volume. Dans ce cas, cela correspond à un angle de bascule et/ou de refocalisation trop élevés en certains points de l'espace car le champ rayonné est trop inhomogène). Par ailleurs, le RSB a été estimé à 50, une valeur faible en particulier par comparaison avec la valeur calculée pour l'antenne #1. L'image D a été acquise après avoir modifié le résonateur afin d'équilibrer les deux boucles. Le RSB a été multiplié par un facteur 2.4 avec une valeur de 120. On peut noter sur le profil II-13.E que l'inhomogénéité droite-gauche a été atténuée mais est toujours présente. On voit en outre sur l'image et sur le profil II-13.F que le signal est très faible au sommet de l'antenne, qui est la zone d'intérêt pour nos applications d'ultrasons transcraniens. Nous avons donc décidé de ne pas retenir cette géométrie.

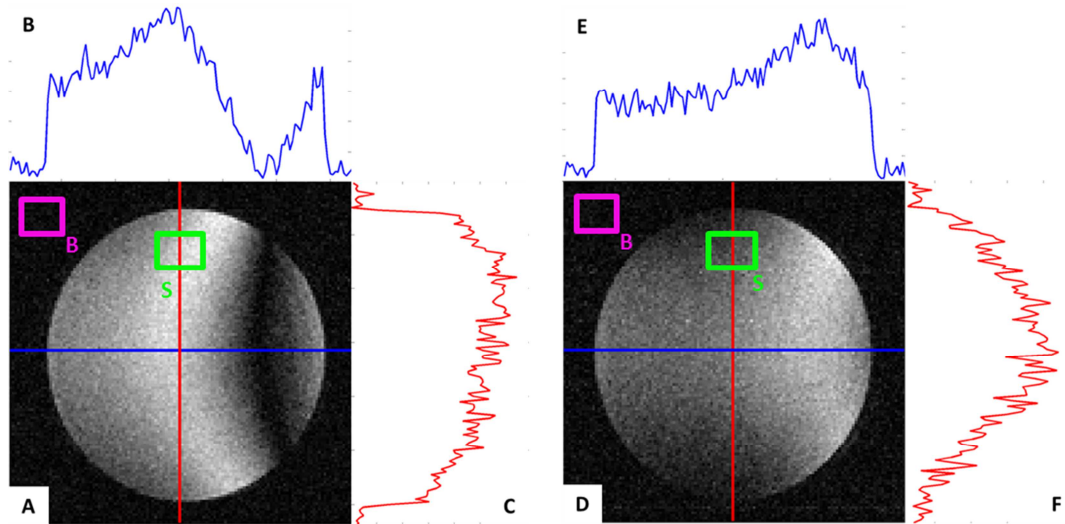


Figure II-13 : Images RARE d'un fantôme d'eau obtenue avec l'antenne #2. A. Coupe centrale, la courbe bleue (resp. rouge) représente la ligne selon laquelle a été réalisé le profil B (resp. C). D. Image obtenue après équilibrage des deux boucles, et profils correspondants (E et F). En vert (resp rose) le ROI de calcul du signal (resp. du bruit).

II-4.3. Antenne simple boucle

Un modèle d'antenne surfacique constituée d'une simple boucle disposée au-dessus de la tête de l'animal a été envisagée (figure II-14), nous la nommerons antenne #3. Le schéma du circuit d'adaptation est similaire à celui de l'antenne #2, mais il est installé à proximité de la boucle afin de conserver la géométrie du résonateur.

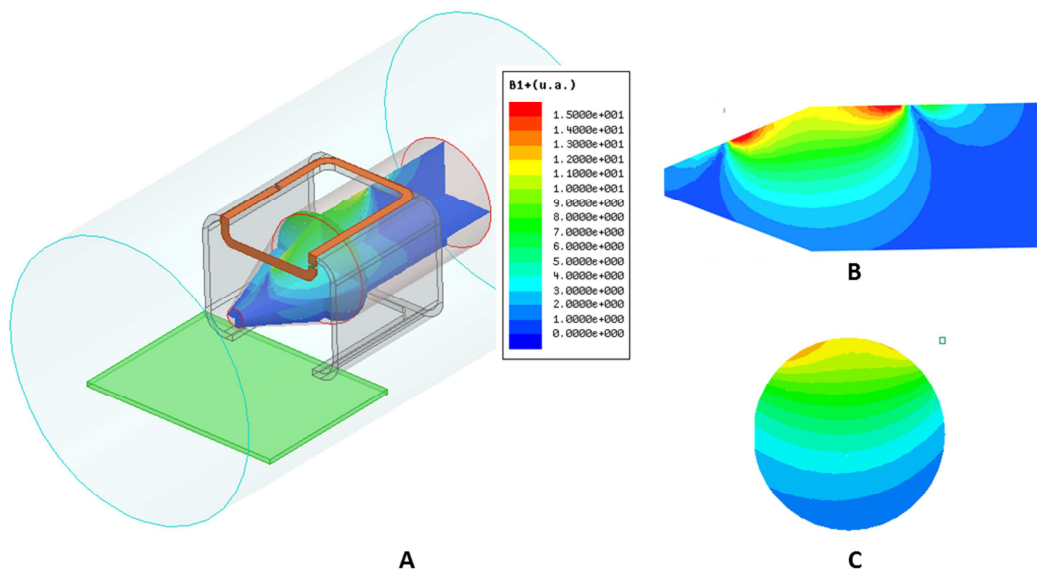


Figure II-14 : Modélisation de l'antenne #3. A. Modèle 3D et champ B_1^+ simulé de l'antenne #3. Coupes sagittale (B) et axiale (C) du champ simulé.

La simulation du champ B_1^+ émis par l'antenne #3 est présentée sur la figure II-14. On observe comme attendu pour une antenne surfacique une bonne homogénéité à proximité de la boucle correspondant ici à la position du cerveau de l'animal, et un champ magnétique moins

important au bas de l'antenne qui correspond à des zones anatomiques moins intéressantes pour nos applications.

Pour la conception de cette antenne, la partie avant est constituée d'un fil de cuivre vernis coudé, permettant d'abaisser ce côté par rapport au reste de la boucle afin de ne pas trop entraver les mouvements du transducteur.

La figure II-15.A montre l'image d'un fantôme d'eau acquise avec l'antenne #3. Le profil B montre une bonne homogénéité du signal selon l'axe droite-gauche. On constate en revanche sur le profil C que le signal décroît en direction de la partie basse de l'image, c'est-à-dire en s'éloignant de l'antenne. Néanmoins, la partie supérieure correspondant à la position du cerveau de l'animal présente un signal suffisant et une bonne homogénéité. Le RSB vaut 260, soit deux fois la valeur calculée pour l'antenne #2.

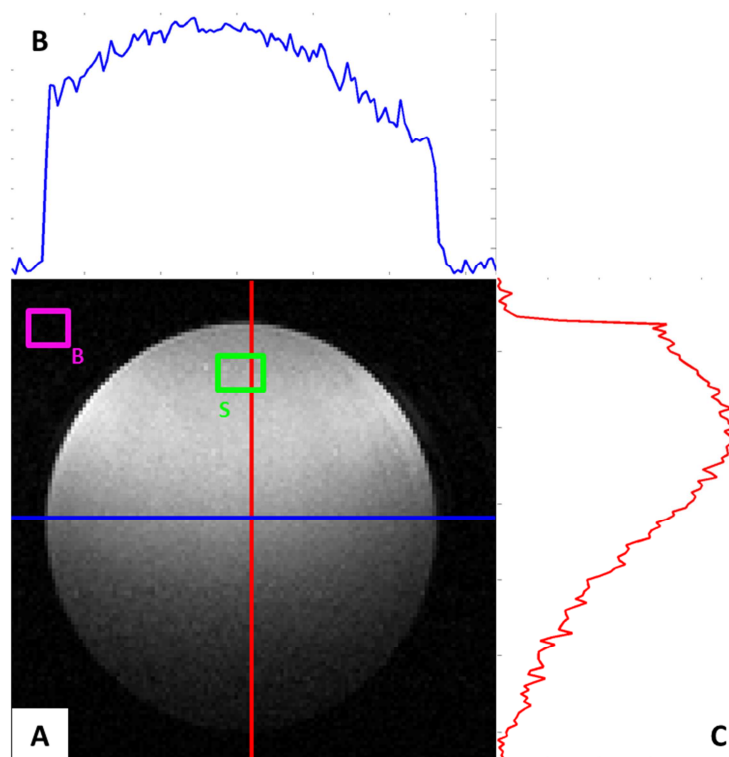


Figure II-15 : Image RARE d'un fantôme d'eau obtenue avec l'antenne #3. A. Coupe centrale, la courbe bleue (resp. rouge) représente la ligne selon laquelle a été réalisé le profil B (resp. C). En vert (resp. rose) le ROI de calcul du signal (resp. du bruit).

La figure II-16 présente des images pondérées T_2 (séquencell-1) d'un rat Sprague-Dawley de 150 g acquises avec l'antenne #3. On observe sur la coupe coronale (II-16.A) un signal homogène sur l'ensemble du cerveau. Les coupes axiales (II-16.B) montrent que le signal dans le cerveau est également relativement homogène dans l'axe dorso-ventral. On note cependant une diminution du signal sur la partie inférieure des images en orientation axiale, à distance de l'antenne comme prévu pour une telle géométrie. Ces zones anatomiques n'étant pas explorées lors d'études sur le cerveau, nous avons retenu ce modèle d'antenne pour la suite des expériences présentées dans ce manuscrit. Inhomogénéité en profondeur du fait de la nature de l'antenne.

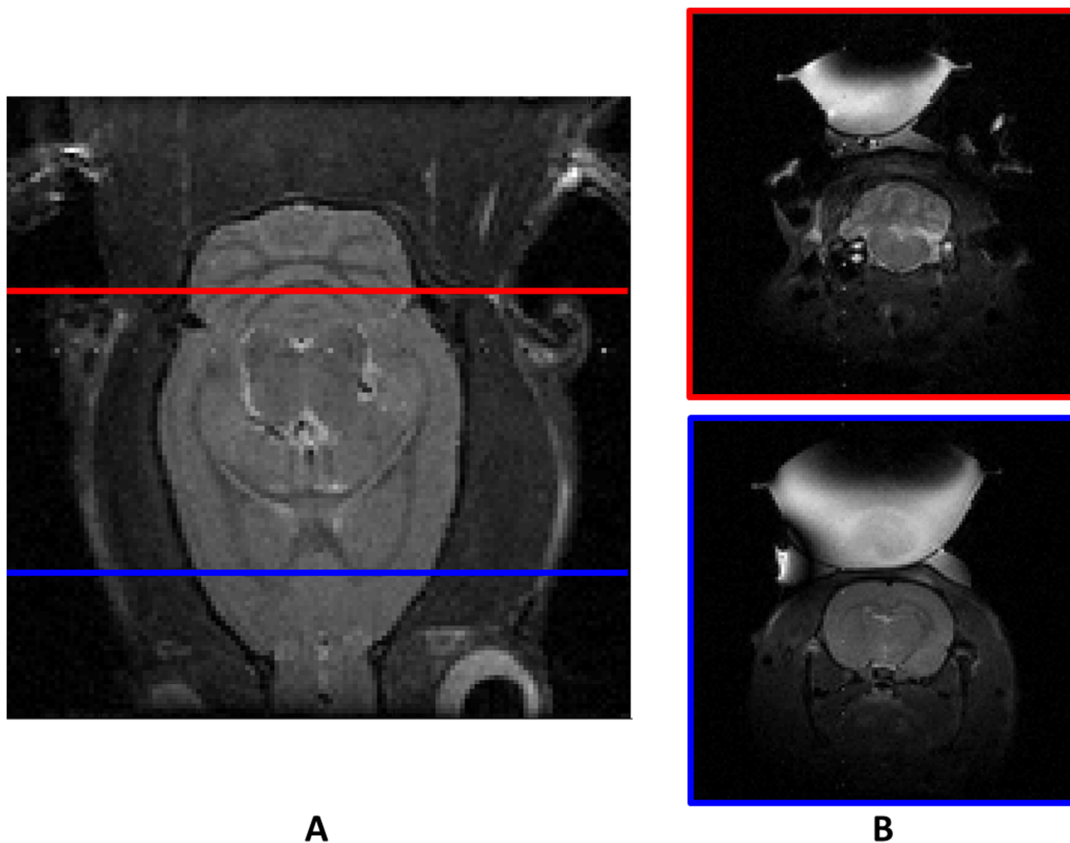


Figure II-16 : Images *in vivo* obtenues avec l'antenne #3. A. Coupe en orientation coronale. Les lignes colorées indiquent la position des coupes axiales (B).

Cette solution reste néanmoins perfectible, en particulier sur les points suivants :

- Nécessité de placer le circuit d'adaptation à proximité immédiate du résonateur, empêchant l'adaptation à distance grâce au système de tiges tournevis.
- Fermeture de la boucle à l'avant de l'animal pouvant potentiellement occasionner une gêne mécanique pour les moteurs et pour l'installation de l'animal.

II-5. Les transducteurs

L'émission d'ultrasons nécessite l'emploi de transducteurs. Les transducteurs que nous avons utilisés durant cette thèse sont faits de composites piezoélectriques compatibles IRM, ce qui assure à la fois leur fonctionnement sous champ magnétique, mais également l'absence de distorsion des images IRM. Les matériaux utilisés par le fournisseur Imasonic avaient fait l'objet d'une sélection en 2008 durant la thèse de Benoit Larrat. Outre la perméabilisation de la BHE, nous avons vu dans le chapitre introductif que les ultrasons transcraniens pouvaient être employés pour d'autres applications, qui nécessitent des transducteurs dédiés. Après quelques rappels utiles sur les transducteurs, nous présentons le protocole mis en place pour les caractériser, et enfin nous détaillerons les différents modèles conçus et leurs applications. Tous les transducteurs présentés ont été fabriqués par la société Imasonic.

II-5.1. Quelques rappels utiles

Outre le matériau qui le constitue, un transducteur ultrasonore est généralement caractérisé par sa géométrie et sa fréquence centrale de fonctionnement. Pour les applications de type HIFU, il est nécessaire de disposer d'une puissance acoustique importante, on s'attachera donc à focaliser les faisceaux ultrasonores, ce qui est généralement réalisé de façon au moins géométrique en utilisant des transducteurs concaves, ainsi que le sont tous les transducteurs présentés dans ce manuscrit.

Lorsque l'on décrit un transducteur concave (calotte sphérique), on le caractérise généralement par son diamètre D , son rayon de courbure F (ou focale géométrique), et sa fréquence centrale. Il est également courant de préciser le rapport $\frac{F}{D}$. Plus ce rapport est bas, plus la tache focale se rapproche d'une sphère, plus il est élevé et plus elle prend la forme d'un grain de riz allongé. Les différents transducteurs que nous présentons ont été conçus de façon à pouvoir être utilisés sur le système motorisé, et sous IRM. Ils sont donc à la fois IRM compatibles, et de taille contrainte afin de rentrer dans le tunnel d'un scanner préclinique. Leurs géométries ont été choisies comme un compromis entre les contraintes de fabrication, l'encombrement et la taille de la tête du rongeur de façon à ce que le faisceau passe intégralement par le crâne.

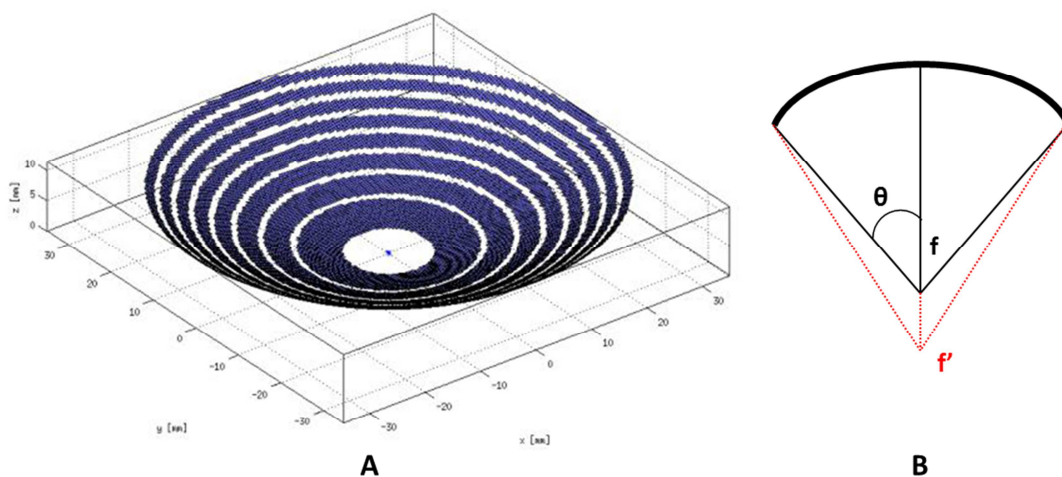


Figure II-17 : A. Représentation schématique d'un transducteur concave constitué de 8 anneaux concentriques et équi-surfaciques. B. Représentation schématique de deux valeurs de focalisation différente : en noir, la focalisation « naturelle », en rouge une profondeur de focalisation différente obtenue en appliquant une loi de retard aux différents éléments.

Selon l'utilisation que l'on a du transducteur, le deuxième paramètre d'importance est la fréquence utilisée. De façon simplifiée, des fréquences basses auront une profondeur de pénétration plus importante mais seront moins focalisées.

Enfin un transducteur peut être constitué de plusieurs éléments. Ce type de construction permet de modifier le champ de pression émis par la sonde ultrasonore en contrôlant amplitude et phase du signal électrique RF transmis à chacun des éléments. Les transducteurs multivoies présentés dans ce manuscrit sont constitués de plusieurs éléments annulaires concentriques et équi-surfaciques (figure II-17.A), dont l'assemblage forme une calotte sphérique. En appliquant un délai au

signal envoyé à chacun des éléments, on peut moduler la position de la tache focale sur l'axe de symétrie du transducteur. La loi de retard suivante a été utilisée pour les simulations :

$$\varphi = \frac{\sqrt{f'^2 - (f \sin \theta)^2} - f \cos \theta - (f' - f)}{c} \quad (\text{II.1})$$

où φ est le délai appliqué à un élément, f est la distance focale géométrique, f' la distance focale désirée, θ l'angle entre l'axe de symétrie du transducteur et le segment joignant le milieu de l'élément considéré au point focal géométrique (figure II-17.B), et c la vitesse de propagation des ondes acoustique dans le milieu.

II-5.2. Simulations et calibrations

Le champ de pression acoustique émis par les différents transducteurs a été simulé grâce au logiciel Field II® (Jensen et al. 1996; Bæk et al. 2010). Ces simulations avaient principalement deux buts :

- Vérifier l'adéquation entre les performances attendues données par la simulation, et les performances réellement mesurées durant la phase de calibration.
- Modéliser le comportement des transducteurs multi éléments lorsque l'on applique un déphasage permettant de modifier la profondeur de focalisation.

Chaque transducteur étant différent de par sa conception, il est également nécessaire de réaliser leur calibration afin de caractériser au mieux leur facteur de conversion électro-mécanique.

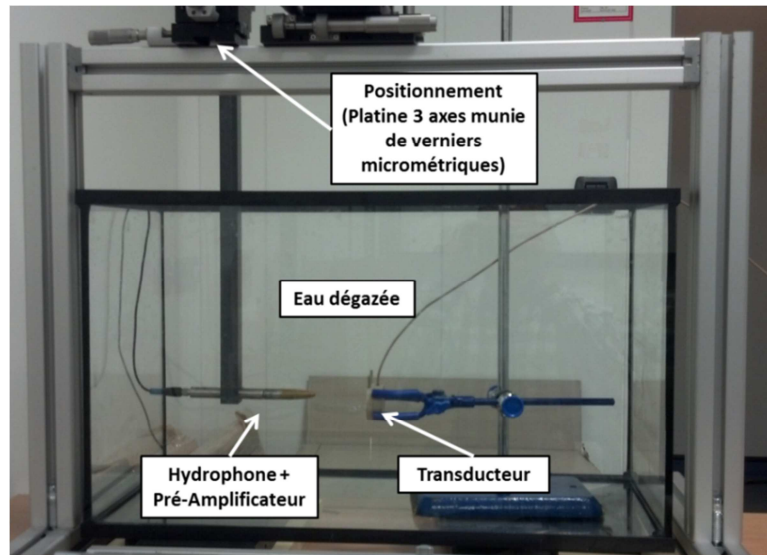


Figure II-18 : Banc de calibration des transducteurs.

Neurospin n'étant pas équipé au début de ma thèse, j'ai mis en place un banc de calibration (figure II-18) constitué d'une cuve en verre, et d'un châssis en aluminium permettant le maintien du transducteur et d'un hydrophone (HGL0200, Onda, Sunnyvale, Californie). Ce dernier est relié à une platine de positionnement micrométrique qui permet d'ajuster l'alignement du transducteur avec l'hydrophone. Préalablement à toute expérience, l'eau contenue dans la cuve est dégazée afin

d'éviter tout phénomène de cavitation. Le taux d'oxygène dissout est mesuré grâce à un oxymètre (Pro20, YSI, Etats-Unis), et l'eau est considérée comme dégazée lorsque ce taux est inférieur à 2 mg.L⁻¹. Le signal de l'hydrophone est visualisé sur un oscilloscope.

Deux types de mesures ont été effectués :

- Un étalonnage de la courbe reliant la puissance électrique fournie au transducteur et la pression acoustique maximum mesurée au point focal pour une fréquence d'excitation correspondant à la fréquence centrale de chaque transducteur. Dans le logiciel ThermoGuide, la puissance transmise au transducteur est exprimée en pourcentage de la tension maximum qui peut être fournie. Ainsi, les courbes de calibration que nous avons construites expriment la pression acoustique en fonction de ce pourcentage.
- Une mesure des largeurs à mi-hauteur des taches focales selon l'axe de symétrie du transducteur, et perpendiculairement à cet axe en déplaçant l'hydrophone grâce à la platine micrométrique.

Les simulations et les calibrations ont été réalisées par Matthieu Gerstenmayer et Benjamin Fellah au cours de leurs stages de master 2 sous mon co-encadrement.

II-5.3. Adapter le transducteur à son utilisation

Deux modèles de transducteurs avaient été développés au cours de la thèse de Benoit Larrat :

- Un transducteur destiné à des applications de type lésions thermiques. Il présente une fréquence centrale de 2,5 MHz qui permet une bonne absorption de l'énergie par les tissus donc une élévation de température importante (Dervishi et al. 2013). Il est constitué d'un seul élément concave, de diamètre 25 mm et de rapport $\frac{F}{D} = 0,8$. Au cours de cette thèse, nous n'avons pas caractérisé cette sonde. Elle est néanmoins compatible avec le système motorisé.
- Un transducteur mono-élément concave de diamètre 25 mm, et de rapport $\frac{F}{D} = 0,8$. Ses caractéristiques sont rappelées sur la figure II-19. La largeur de la tache focale à mi-hauteur mesurée en cuve est de $1,2 \times 1,2 \times 5,8 \pm 0.1 \text{ mm}^3$.

Afin de compléter les applications possibles avec ces deux modèles, nous avons cherché au cours de ma thèse à développer de nouveaux transducteurs en axant notre travail sur les points suivants :

- Réaliser des sondes multi-éléments afin de pouvoir modifier la profondeur de la tache focale, ce qui couplé à l'utilisation des moteurs permet un choix de la position dans les trois directions.
- Disposer d'un transducteur de fréquence centrale plus basse, nécessaire pour certaines applications comme la neurostimulation.
- Disposer d'un détecteur de cavitation permettant de mieux contrôler les effets indésirables.

Pour chacun des transducteurs présentés, un boîtier d'adaptation d'impédance a été développé par IGT afin de garantir une transmission optimale de la puissance électrique. Chacun de ces transducteurs est entouré d'une boîte à eau, et muni d'un ballon en latex qui va permettre une circulation d'eau autour du composite piezoélectrique. Ceci présente deux intérêts :

- Le ballon permet un bon couplage entre le transducteur et le crâne de l'animal.
- Pouvoir faire circuler de l'eau autour de la surface active permet également de la refroidir lorsqu'elle est sollicitée par des tirs continus, comme c'est le cas lorsque l'on réalise des applications thermiques.

Un système de dégazage externe intégré à l'armoire électronique de pilotage du système motorisé permet de dégazer l'eau circulant autour des transducteurs afin d'éviter les phénomènes de cavitation.

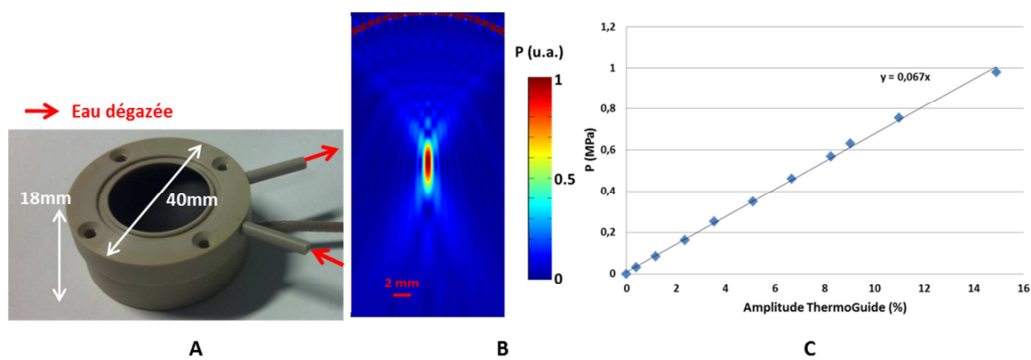


Figure II-19 : Transducteur 1,5MHz monovoie. A. Photographie du transducteur. B. Champ de pression simulé. C. Pression acoustique au point focal en fonction de l'amplitude choisie dans ThermoGuide avec une fréquence d'excitation de 1,5 MHz.

II-3.5.a) Transducteur 8 canaux à 1,5 MHz

Pour les applications de perméabilisation de la BHE, nous avons choisi de travailler à 1,5 MHz, une fréquence représentant pour le rongeur un bon compromis entre sa transmission à travers le crâne et la taille de la tache focale. En plus du transducteur mono-élément existant à cette fréquence, nous avons développé un deuxième transducteur (figure II-20.A) reprenant les mêmes caractéristiques géométriques mais constitué de 8 éléments annulaires, permettant de modifier la profondeur de focalisation en déphasant les éléments les uns par rapport aux autres. La figure II-20.B montre le champ émis simulé pour deux valeurs différentes de profondeur de focalisation électronique. On peut noter que la tache focale s'élargit et surtout s'allonge lorsque le déphasage entre les éléments est augmenté. Pour un déphasage nul, nous avons mesuré une largeur de la tache focale à mi-hauteur de $1,2 \times 1,2 \times 6,6 \pm 0,1 \text{ mm}^3$.

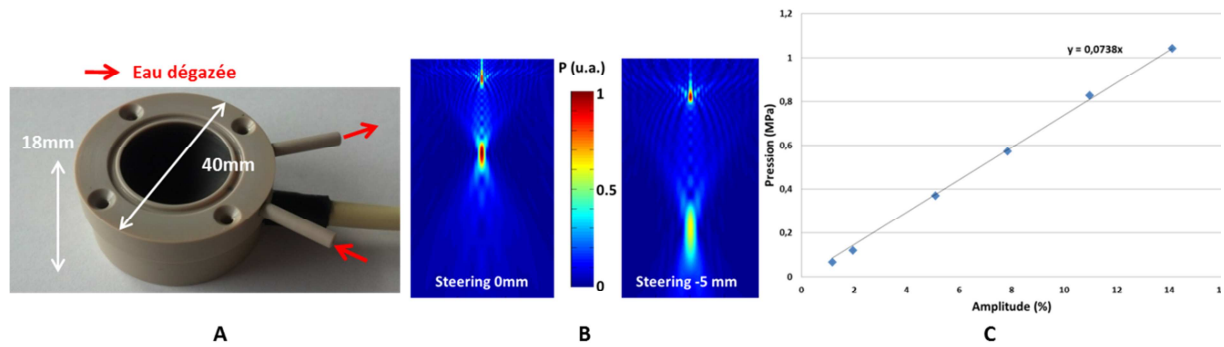


Figure II-20 : Transducteurs 1,5 MHz 8 voies. A. Photographie du transducteur. B. Champs de pression simulés pour deux valeurs de steering (profondeur de focalisation) différentes. 0 mm correspond à un déphasage nul entre les éléments, et la distance -5 mm est calculée par rapport à la position 0 mm. Le transducteur est situé au-dessus des images, et la même échelle est utilisée. C. Pression en fonction du pourcentage choisi dans ThermoGuide à 1,5 MHz

II-3.5.b) Transducteur 6 canaux 0,650 MHz

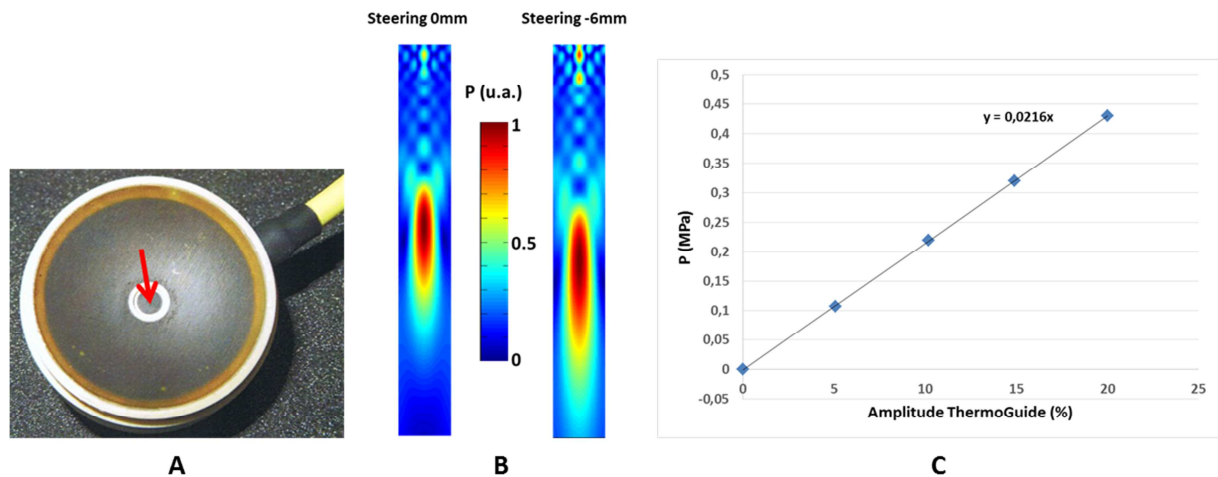


Figure II-21 : Transducteurs 0,625 MHz 6 voies. A. Photographie du transducteur. La flèche rouge indique le détecteur de cavitation inséré au centre de la sonde. B. Champs de pression simulés pour deux valeurs de steering (profondeur de focalisation) différentes. 0 mm correspond à un déphasage nul entre les éléments, et la distance -6 mm est calculée par rapport à la position 0 mm. Le transducteur est situé au-dessus des images. C. Pression en fonction du pourcentage choisi dans ThermoGuide à 0,625 MHz.

Pour les applications de neurostimulation, les fréquences utilisées sont généralement plus basses (Deffieux et al. 2013; Tyler et al. 2008), un transducteur concave constitué de six éléments annulaires et avec une fréquence centrale de 0,650 MHz a donc été conçu. Il possède un diamètre de 30 mm et un rapport $\frac{F}{D}$ de 1. Il présente la particularité d'un trou circulaire en son centre d'un diamètre de 7 mm permettant d'accueillir un transducteur de dimension inférieure et de fréquence centrale égale au triple de celle du réseau annulaire (figure II-21.A). Pour un déphasage nul entre les différents éléments, la largeur de la tache focale à mi-hauteur a été mesurée à $2,2 \times 2,2 \times 25,6 \pm 0,1 \text{ mm}^3$. L'hydrophone dont nous disposons n'ayant pas été étalonné pour la fréquence de 650 kHz, la courbe de calibration a été réalisée à l'institut Langevin par interférométrie optique, avec l'aide de Bastien Arnal (Institut Langevin, Paris, France).

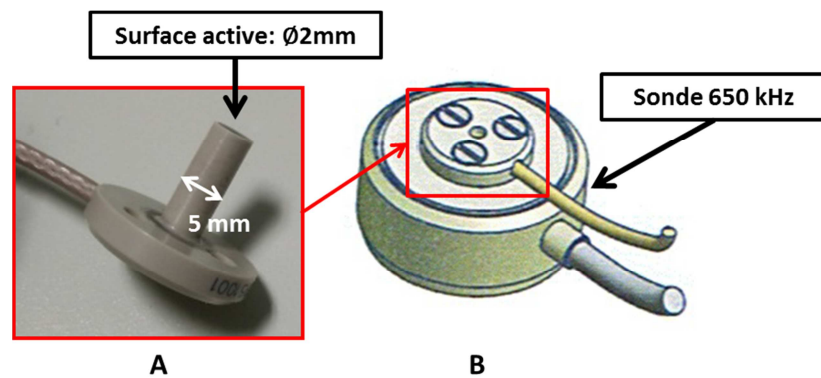


Figure II-22 : Transducteur plan permettant de détecter la cavitation. A. Photographie du transducteur. B. Intégration de ce transducteur au centre de la sonde 650 kHz.

Un transducteur circulaire plan, de diamètre 2 mm et de fréquence centrale 2 MHz a été développé pour être utilisé uniquement en réception en tant que détecteur de cavitation. Il peut s'adapter au centre de la sonde 0,650 MHz (figure II-22). Son fonctionnement a été validé *in vivo* par Benjamin Fella au cours de son stage de master sur des rats Sprague-Dawley ($n = 3$, 150-350 g, Janvier, France). Des tirs ultrasonores transcraniens sont réalisés selon le protocole utilisé pour la perméabilisation de la BHE ponctuelle (voir chapitre IV), initialement sans injection de microbulles, puis avec injection de microbulles Sonovue® (Bracco, Italie, cf chapitre IV). Le signal reçu par le transducteur plan est enregistré pendant les tirs ultrasonores, puis sa transformée de Fourier est réalisée. La fréquence centrale du transducteur 650 kHz est filtrée numériquement. En l'absence de microbulles, on observe uniquement la première harmonique (figure II-23.A). Après injection de Sonovue®, on voit apparaître sur le spectre du signal des harmoniques d'ordre supérieur (figure II-23.B), signe de cavitation stable. Afin de ne pas créer de dommages tissulaires aux animaux, nous n'avons pas cherché à créer de cavitation inertielle, qui devrait se manifester par un spectre plus large bande. Cette validation sera faite ultérieurement *in vitro*.

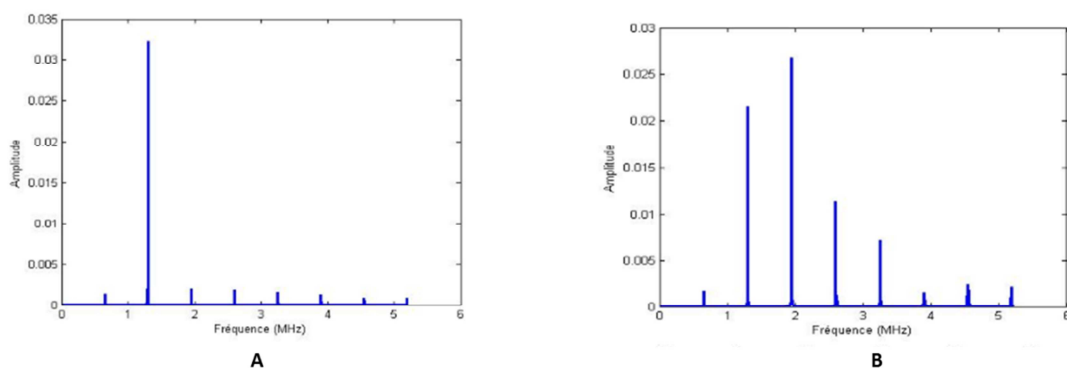


Figure II-23 : Spectres des signaux enregistrés par le détecteur de cavitation. A. En l'absence de microbulles, seule la première harmonique est observée, il n'y a pas de cavitation. B. En présence de microbulles, l'apparition d'harmoniques d'ordre supérieur signe la présence de cavitation stable.

Pour chacun des transducteurs caractérisés, nous avons pu vérifier que la relation entre la tension électrique délivrée et la pression acoustique au point focal était linéaire. La connaissance du

facteur de proportionnalité est essentielle pour pouvoir ensuite calculer la pression acoustique utilisée lors des applications *in vivo*. Pour les transducteurs multi-éléments, nous avons également pu confirmer que les lois de retard appliquées aux différents éléments permettaient bien un décalage de la tache focale égal à la distance désirée.

II-6. Caractérisation du facteur de transmission de crâne de rats

La pression acoustique joue un rôle primordial sur les effets des ultrasons. En effet, une pression trop faible ne permet pas de perméabiliser la BHE, tandis qu'une pression trop élevée entraîne des dommages irréversibles. Il est donc important de pouvoir caractériser sa valeur *in situ* de façon précise, pour pouvoir garantir que le protocole soit sûr et reproductible.

Au paragraphe ci-dessus, nous avons présenté la calibration des transducteurs, permettant de relier la pression acoustique délivrée au point focal en espace libre à la puissance électrique transmise au transducteur. Néanmoins, lors d'applications transcrâniennes, les ultrasons sont atténués au passage du crâne de l'animal et la pression au point focal est inférieure à celle mesurée en cuve. Il est alors important de connaître avec précision le facteur de transmission du crâne afin d'avoir une bonne estimation de la pression acoustique réellement délivrée lors d'applications *in vivo*. L'objectif de ce paragraphe est de présenter des mesures de facteur de transmission en pression acoustique, effectuées avec l'aide de Benjamin Fellah et Matthieu Gerstenmayer. Nous avons dans un premier temps étudié la dépendance de ce facteur de transmission avec le poids de l'animal, puis dans un deuxième temps nous avons cherché à cartographier sa valeur selon la région du crâne considéré.

II-6.1. Facteur de transmission du crâne en fonction du poids de l'animal

Dans un premier temps, des crânes de rats Sprague-Dawley de différents poids ($n = 11$) ont été prélevés et la partie supérieure a été séparée du reste du crâne. Dans la suite de ce paragraphe, nous désignerons par crâne cette partie supérieure.

Afin de réaliser ces mesures, nous avons utilisé le dispositif présenté pour la calibration des transducteurs en cuve équipé de 2 platines de déplacement 3D avec verniers micrométriques. Préalablement à la mesure, les crânes sont immergés durant 2 jours dans de l'eau dégazée afin d'éliminer toute bulle éventuelle qui engendrerait de la cavitation ou modifierait la réflexion des ultrasons. Le crâne est ensuite maintenu entre le transducteur et l'hydrophone de façon à intersecter le faisceau ultrasonore comme le montre la figure II-24.A. Le transducteur est alimenté grâce à un générateur de signaux portable développé par la société IGT (figure II-24.B). Le facteur de transmission a été évalué en faisant le rapport de la pression mesurée au point focal avec et sans le crâne. Pour chacun des crânes, il a été évalué en trois zones différentes: une zone située à l'avant du bregma, une zone située entre le bregma et le lambda et enfin une zone située à l'arrière du lambda (figure II-25).

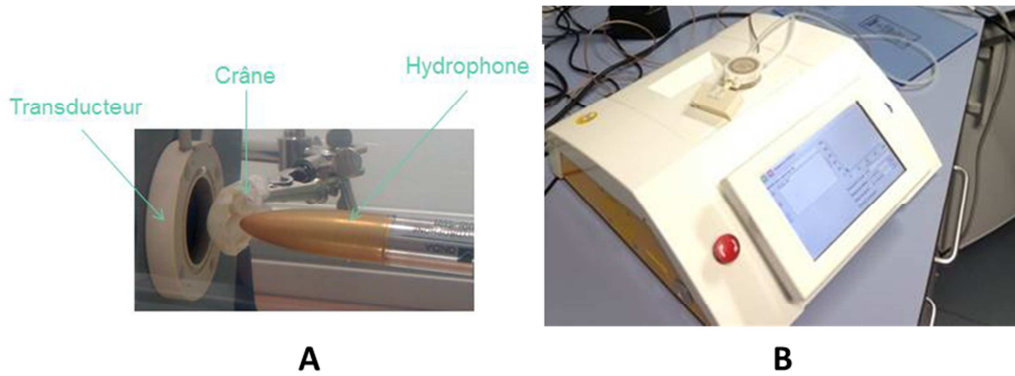


Figure II-24 : Dispositif utilisé pour la mesure des facteurs de transmission des crânes de rat. A. Le crâne est situé entre le transducteur et l'hydrophone. Le crâne et l'hydrophone sont chacun reliés à une platine de déplacement micrométrique. B. Générateur de signaux utilisé pour les mesures. L'ensemble de la séquence ultrasonore désirée peut être programmée et enregistrée grâce à une interface tactile.

L'ensemble des mesures a été réalisé à 1,5 MHz, la fréquence utilisée pour nos applications de perméabilisation de la BHE. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure II-25. On observe que le facteur de transmission semble varier linéairement avec le poids de l'animal. En ce qui concerne le facteur de transmission à l'arrière du crâne, il atteint un plateau pour des animaux de poids supérieur à 400 g. Enfin, bien que les facteurs de transmission soient similaires pour toutes les positions chez des animaux de poids inférieur à 200 g, on peut noter qu'il devient plus faible à l'arrière du crâne pour des rats de poids plus importants. Ceci confirme le résultat d'une étude publiée en 2011 (O'Reilly, Muller, & Hynynen, 2011), en complétant les données pour des animaux de poids inférieurs à 200 g, généralement utilisés lors d'expériences sous IRM pour lesquelles la taille des animaux est limitée.

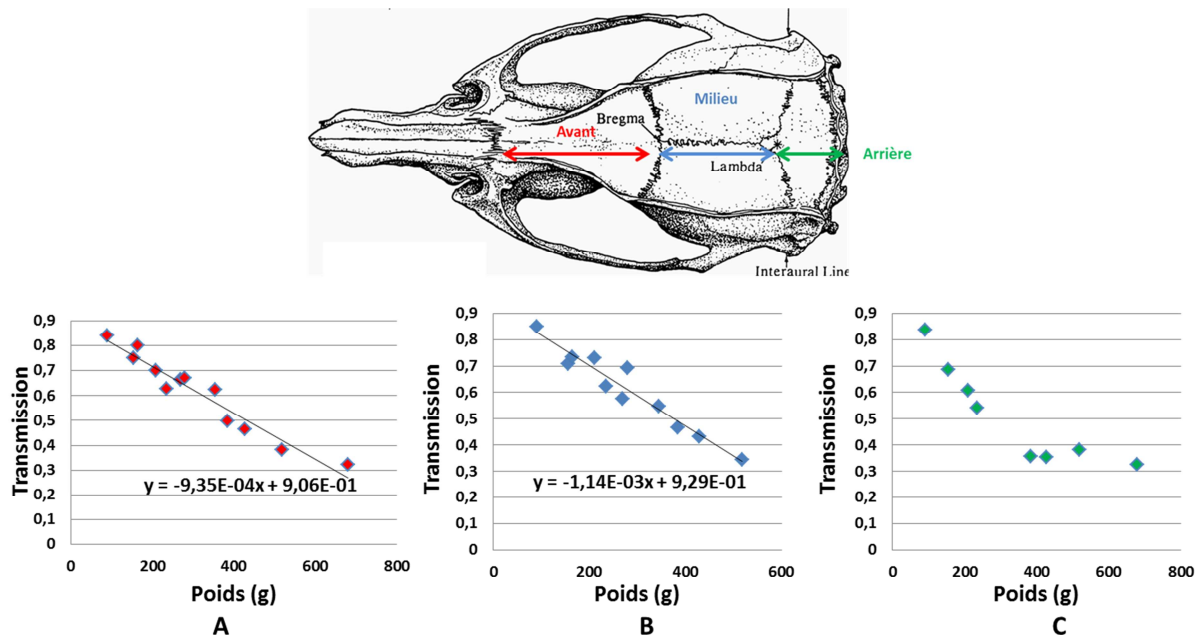


Figure II-25 : Facteur de transmission des crânes de rat en fonction du poids : A. Avant du crâne, B. milieu du crâne, et C. arrière du crâne.

On peut également noter que pour une même position, les valeurs du facteur de transmission varient assez fortement avec le poids, puisqu'elles peuvent être quasiment divisées par trois. Ces résultats montrent donc l'importance à accorder au facteur de transmission choisi lors du calcul de la pression acoustique *in situ*, à ajuster en fonction du poids des animaux à traiter, si l'on souhaite garantir la reproductibilité et la sûreté de la procédure.

II-6.2. Cartographie du facteur de pression d'un crâne de rat

Les mesures précédentes ont été effectuées selon un axe de symétrie du crâne de rat avant/arrière, le faisceau intersectant le crâne en sa ligne centrale. On peut déjà noter pour un même crâne des différences de facteur de transmission en fonction de la position choisie. Afin d'obtenir une mesure plus précise, nous avons décidé de réaliser une cartographie plus extensive du facteur de transmission d'un crâne de rat. Le but final de cette étude étant d'obtenir une connaissance plus précise de la pression réelle *in vivo*, une cartographie du signal ARFI a d'abord été générée *in vivo*, puis une mesure en cuve a été effectuée sur le crâne du même animal afin de pouvoir les comparer.

II-2.6.a) Cartographie du signal ARFI

Un rat Sprague-Dawley (320 g, Janvier, France) est anesthésié à l'isoflurane (1,5-2 %) dans un mélange d'air et d'oxygène. Sa tête est rasée, puis il est installé dans le lit du système motorisé, maintenu de façon stéréotaxique. Le transducteur est alors installé au-dessus du crâne, couplé par le ballon d'eau et du gel échographique, et l'animal est introduit dans l'IRM.

Plusieurs séquences ARFI (figure II-26) sont alors réalisées, en déplaçant le transducteur de 1 mm (direction rostro-caudal puis droite-gauche) entre chaque acquisition de façon à couvrir l'intégralité de l'hémisphère droit de l'animal. Pour des raisons de symétrie, les acquisitions sont réalisées sur un seul hémisphère.

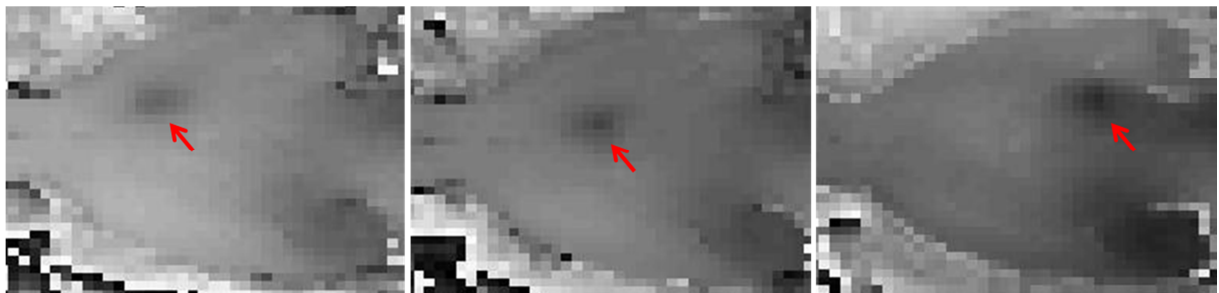


Figure II-26 : Exemples d'images de phase ARFI acquises à différentes positions du transducteur. Les flèches rouges désignent la position de la tache focale.

Nous avons vu dans le chapitre introductif que la pression acoustique était proportionnelle à la racine carrée de la différence de phase des images IRM acquises avec et sans ultrasons. Dans le cadre de cette expérience, nous n'avons pas acquis de carte de phase sans ultrasons, aussi la valeur de la phase de référence a été mesurée dans le voisinage de la tache focale, puis a été retranchée à l'ensemble de l'image. Nous avons ensuite récupéré sur chacune des images le maximum de cette différence considéré comme le point focal. Sa racine carrée a alors été calculée pour obtenir une

carte théoriquement proportionnelle à la pression acoustique. Enfin, cette carte a été normalisée par le signal maximum.

II-2.6.b) Mesures en cuve

Le crâne du rat utilisé pour les mesures ARFI a été extrait. Sa partie supérieure est ensuite maintenu 2 jours dans de l'eau dégazée préalablement à la mesure.

En utilisant le même protocole en cuve qu'au paragraphe précédent, la pression acoustique au point focal est enregistrée, puis le crâne est déplacé de 1 mm (axe rostro caudal ou droite gauche) avant que la mesure ne soit répétée, et ainsi de suite jusqu'à ce que la moitié du crâne située au-dessus d'un hémisphère cérébral soit entièrement parcourue. En chaque point, le facteur de transmission est calculé comme le rapport de la pression avec le crâne et de la pression au point focal en eau libre. A noter que pour chaque mesure, le maximum de la tache focale est de nouveau recherché car il peut avoir légèrement bougé du fait des distorsions de faisceau au passage du crâne.

II-2.6.c) Résultats

La figure II-27 présente les cartographies obtenues selon les deux méthodes de mesure. On peut déjà observer que l'aspect général de répartition est comparable, ce qui confirme l'intérêt de disposer d'une telle cartographie in situ.

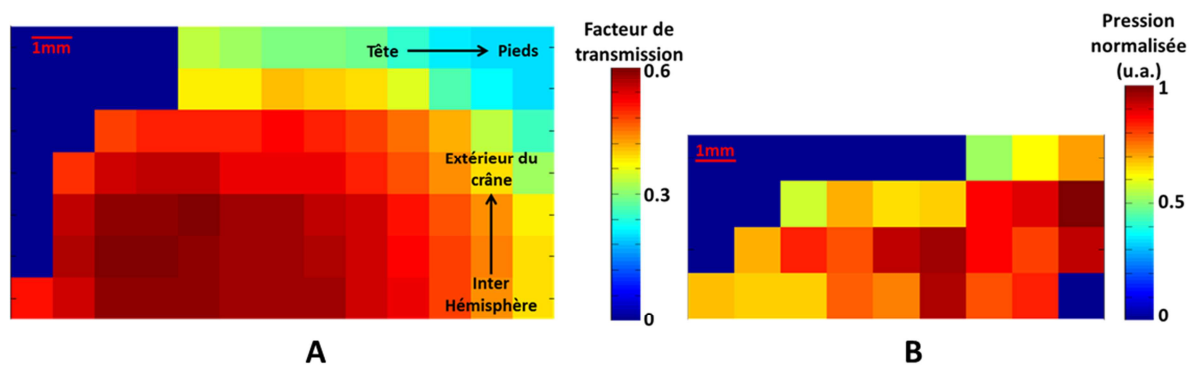


Figure II-27 : Cartographie du facteur de transmission de l'hémisphère d'un crâne de rat. A. Cartographie réalisée en cuve. B. Pression normalisée calculée à partir du signal ARFI du vivant de l'animal.

Sur les données en cuve, on retrouve la tendance observée dans les mesures précédentes, avec un facteur de transmission plus important au milieu et à l'avant du crâne que dans sa partie postérieure. On peut également noter que le facteur de transmission décroît sensiblement sur l'extérieur du crâne, les valeurs pouvant être jusqu'à trois fois plus faibles qu'au centre du crâne.

Sur la cartographie réalisée sous IRM, on peut observer que le facteur de transmission est plus faible à l'avant du crâne. Cet effet pourrait être expliqué par des difficultés de couplage qui apparaissent dans les expériences *in vivo*. Nous avons également observé expérimentalement que l'angle d'incidence du faisceau jouait un rôle important sur la transmission de l'énergie ultrasonore à travers le crâne, aussi une différence de parallélisme entre les différentes mesures pourrait-elle expliquer cet effet. Il est à noter que le signal ARFI dépend également de la réponse viscoélastique du milieu considéré, qui n'a pas été prise en compte dans cette première expérience et pourrait

expliquer certaines différences avec les mesures effectuées en cuve. Enfin, ces premiers résultats sont à nuancer également par le traitement des données partiellement incomplet que nous avons effectué. Comme nous l'avons précisé nous n'avons pas acquis d'image de référence sans ultrasons, aussi les différences de phase mesurées ne sont pas parfaitement exactes

Ces résultats sont à prendre en considération lorsque l'on envisage de traiter des zones différentes du cerveau afin de régler correctement les paramètres acoustiques utilisés. Nous verrons dans le chapitre IV que ces informations pouvaient être utilisées pour obtenir une perméabilisation plus homogène lorsque l'on cherche à cibler des régions étendues (expérience d'ouverture globale de la BHE).

II-7. Perspectives

II-7.1. Améliorations techniques envisagées

Au cours des études présentées dans les chapitres suivants, nous avons identifié plusieurs points d'amélioration qui permettrait de faciliter les expériences sur ce système motorisé ou d'élargir ses champs d'application.

II-1.7.a) Lits adaptés à d'autres espèces

Nous développons actuellement un modèle optimisé pour réaliser le protocole de perméabilisation de la BHE sur des souris. Les changements principaux consistent à adapter la taille des éléments à la morphologie de ces animaux, en particulier le système de stéréotaxie et l'antenne.

II-1.7.b) Système de stéréotaxie

Le réglage du mors en hauteur n'est pas pratique à utiliser, et gêne même parfois l'installation de l'animal. Du fait du bras de levier important, il peut avoir tendance à ne pas tenir en position haute, ce qui entraîne une inclinaison du crâne de l'animal vers l'avant. Il n'est alors plus parfaitement horizontal, ce qui a pour conséquences un découplage éventuel du transducteur. D'autre part, le faisceau étant perpendiculaire à la surface du transducteur, il est important que le cerveau soit le plus parallèle possible à cette surface afin d'avoir un profil de pression connu au sein d'une même coupe d'imagerie, en particulier pour l'imagerie ARFI.

II-1.7.c) Support du transducteur

Nous avons constaté que la liaison rotule du transducteur n'est pas suffisamment rigide, et que sa trop grande liberté de mouvement rend difficile le positionnement horizontal du transducteur. D'autre part, ce système ne permet pas de plaquer correctement le transducteur sur la tête de l'animal (du haut vers le bas) afin de maximiser le couplage. Ceci est dommageable notamment lorsque l'on réalise des tirs en déplaçant le transducteur, le mouvement répété pouvant entraîner un découplage progressif du transducteur, ce qui nuit à la reproductibilité des expériences. Des solutions plus pertinentes sont actuellement étudiées par les ingénieurs de la société IGT.

II-1.7.d) Développement d'un support pour la queue de l'animal

Le lit étant de longueur limitée, la queue des animaux de plus de 200 g dépasse du lit. Ceci peut entraîner la sortie du cathéter intracaudal de la veine, ce qui nécessite de recommencer toute l'installation de l'animal et implique donc une perte de temps. Pour répondre à ce problème, j'ai conçu une pièce que nous nommerons porte-queue, fixée à l'arrière du lit et présentée sur la figure II-28. La queue de l'animal est portée par ce dispositif, qui permet en outre de fixer les seringues utilisées lors des injections.

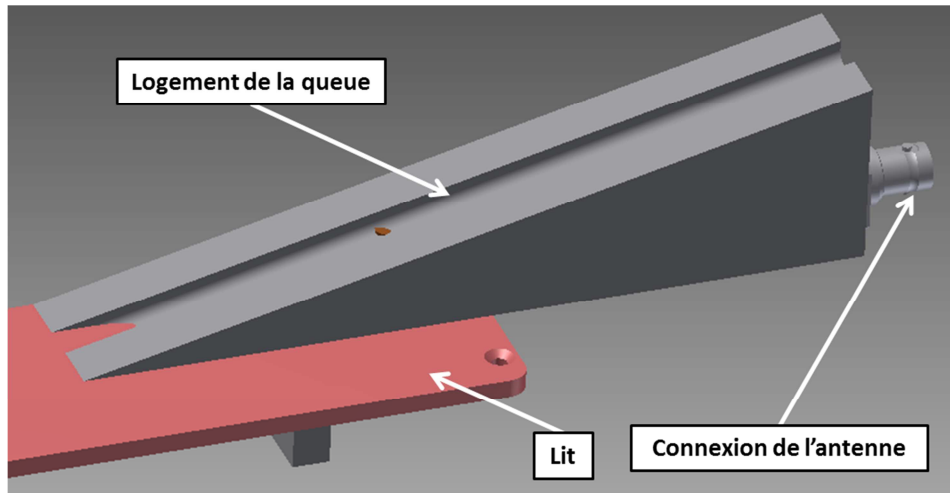


Figure II-28 : Dessin 3D du porte-queue conçu. Il est fixé à l'arrière du lit, et une gouttière supporte la queue pour les animaux de poids important.

II-1.7.e) Antenne RF

Afin de répondre aux problèmes présentés par l'antenne actuel et listés au paragraphe II-4.3, de nouveaux modèles sont actuellement étudiés. Les points d'amélioration principaux sont les suivants :

- Antenne volumique pour une meilleure homogénéité du signal
- Possibilité de l'adapter depuis l'extérieur de l'IRM
- Eviter une gêne dans le mouvement du transducteur
- Si possible l'isoler du gel échographique

II-1.7.f) Transducteurs

Nous avons présenté dans le paragraphe II-5 l'ensemble transducteur 0,625 MHz/ détecteur de cavitation conçu pour les applications de neurostimulation ainsi que les premiers résultats de caractérisation de cavitation *in vivo*. Un tel dispositif pourrait également être utile sur les transducteurs utilisés pour les applications de perméabilisation de la BHE. En effet, être en mesure de détecter la cavitation lors d'une procédure de perméabilisation de la BHE permet d'augmenter la sécurité du protocole puisque les dommages observés sont principalement imputés à l'apparition de cavitation inertielle (cf chapitre V). Des solutions sont actuellement étudiées en collaboration avec la société Imasonic afin de concevoir un nouveau transducteur multi-éléments 1,5 MHz accueillant un détecteur de cavitation.

II-7.2. Cartographie du facteur de transmission d'un crâne de rat par imagerie ARFI

Afin de répondre aux difficultés rencontrées dans l'expérience présentée au paragraphe II-6.2, cette mesure fera l'objet d'un travail plus raffiné au cours de la thèse de Mathieu Gerstenmayer, en veillant notamment à améliorer les points suivants :

- Acquisition de cartes de référence sans ultrasons qui seront soustraites aux images utiles.
- Amélioration de la résolution et de la sensibilité des acquisitions.
- Soin particulier apporté au couplage et au parallélisme du transducteur.
- Prise en compte des propriétés viscoélastiques des tissus.

II-8. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons rappelé l'intérêt et les enjeux que présentait la mise en place d'un dispositif motorisé d'ultrasons sous IRM. Nous avons notamment rappelé les difficultés liées aux contraintes spatiales imposées par le diamètre restreint du tunnel d'un scanner IRM préclinique.

Nous avons présenté les solutions adoptées pour répondre au cahier des charges défini, ainsi que les différentes étapes du développement d'un tel système. Nous avons notamment détaillé l'intégration d'un système stéréotaxique et d'une antenne radiofréquence sur un lit amovible, permettant la réalisation d'expériences d'ultrasons guidées par IRM avec la possibilité de déplacer le transducteur ultrasonore.

Nous avons également présenté les résultats de calibration de transducteurs nouvellement développés, en particulier des sondes multi-éléments permettant de choisir la profondeur de la tache focale. Nous avons également validé un dispositif de détection de la cavitation intégré à la sonde 0,625 MHz.

Enfin nous avons présenté des mesures de facteurs de transmission de crânes de rat. Nous avons montré que ces calibrations étaient nécessaires afin d'estimer précisément la pression acoustique délivrée aux tissus cérébraux lors d'expériences *in vivo*.

III. Développement d'outils logiciels pour guider les ultrasons

Afin de compléter les développements matériels présentés au chapitre précédent, nous avons développé durant ma thèse plusieurs outils logiciels pour faciliter le guidage des ultrasons. Dans ce chapitre, nous présentons le développement d'une transmission des images en temps réel du scanner IRM vers la console des ultrasons, puis nous décrivons des outils mis au point pour piloter les moteurs sur la base de ces images.

III-1. Transmission d'images en temps réel

Pour certaines applications, il peut être crucial de suivre en temps réel les effets des ultrasons sur les tissus cérébraux. On peut par exemple citer le cas de l'ablation thermique, pour laquelle il est intéressant de suivre au cours du temps l'échauffement des tissus afin de ne pas délivrer une dose trop forte et risquer d'endommager des tissus adjacents. Dans le cas de la perméabilisation de la BHE, nous souhaitons également pouvoir réaliser un rétro-contrôle de la position du transducteur sur la base des images ARFI. Le pilotage des moteurs s'effectuant depuis la console ultrasons grâce au logiciel ThermoGuide, il était nécessaire de pouvoir transmettre et afficher en temps réel les images sur cette console déportée. La figure III-3 résume les connexions entre les différents éléments de l'expérience. Nous avons donc décidé de mettre en place une solution de transmission en temps réel des données acquises par l'IRM vers une console externe en utilisant le protocole TCP/IP.

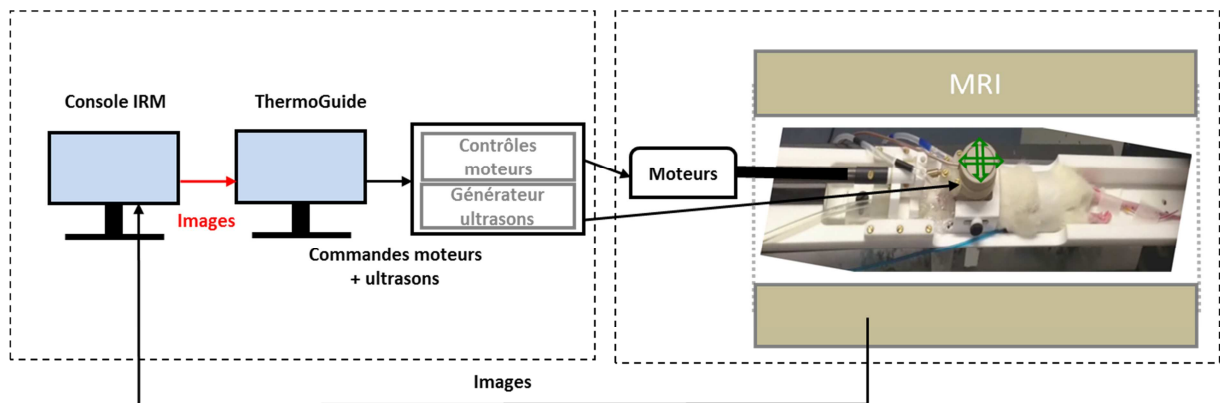


Figure III-1 : Schéma des communications existantes (en noir) et désirées (en rouge) entre les différents éléments de l'expérience.

L'objectif de ce paragraphe est de rappeler brièvement l'établissement d'un schéma de communication client/serveur par protocole TCP/IP via l'utilisation des sockets, puis de décrire le protocole que nous avons mis en place pour transmettre les images du scanner en temps réel. Une partie de ce travail a été réalisé en collaboration avec Frédéric Salabartan.

III-1.1. Bref rappel sur le protocole TCP/IP

TCP/IP est l'abréviation de « Transmission Control Protocol »/ « Internet Protocol », il s'agit donc d'un protocole permettant de transmettre des données sur un réseau. On distingue dans ce nom les deux couches IP et TCP.

Dans un protocole TCP/IP, la partie IP prend en charge l'acheminement des données d'une machine à une autre. La couche TCP, supérieure à la couche IP, garantit la bonne transmission des paquets (bon destinataire et bon ordre). En particulier, les paquets altérés ou perdus durant l'acheminement seront retransmis. Ce protocole garantit une transmission extrêmement fiable, et est à ce titre largement utilisé pour un grand nombre de communications, notamment pour tous les flux Internet. Il est donc particulièrement adapté aux applications que nous visons, puisqu'il est essentiel de disposer de l'intégralité des données pour un affichage correct des images. D'autre part, du fait de sa grande popularité, il existe un nombre important d'outils permettant de l'implémenter pour communiquer entre plusieurs applications. Un des outils les plus répandus est nommé les « sockets ».

III-1.2. Utilisation des sockets pour la création d'un environnement client/serveur

L'envoi des images que nous avons développé est basé sur le schéma client/serveur, qui est le modèle le plus couramment utilisé pour l'échange de données entre plusieurs applications.

Dans un tel environnement, on distingue deux entités différentes : une application client, et une application serveur. Elles sont généralement localisées sur des ordinateurs distants, mais peuvent aussi fonctionner sur une même machine. Le principe de fonctionnement est le suivant : le client soumet une requête au serveur, puis le serveur répond à cette requête. Le nombre de clients, ou la nature des services peuvent varier, mais il est essentiel que le langage entre les deux applications soit commun.

Afin de pouvoir communiquer entre ces deux applications, l'interface de connexion la plus utilisée est les « sockets ». On les décrit généralement comme des prises permettant aux applications de se brancher sur le réseau afin de pouvoir échanger des données. Disponibles dans la plupart des langages de programmation, leur utilisation est robuste et portable, nous avons donc choisi cette solution. La figure III-2 illustre brièvement leur principe de fonctionnement.

Notons enfin que la transmission des données au sein des sockets s'effectue par blocs d'octets, sans tenir compte de leur signification. Aussi, même si le protocole TCP garantit que ces blocs arrivent dans le bon ordre, il est nécessaire de définir un protocole de découpage des données qui soit commun aux applications client et serveur, afin que chacun puisse interpréter correctement les données qu'il reçoit.

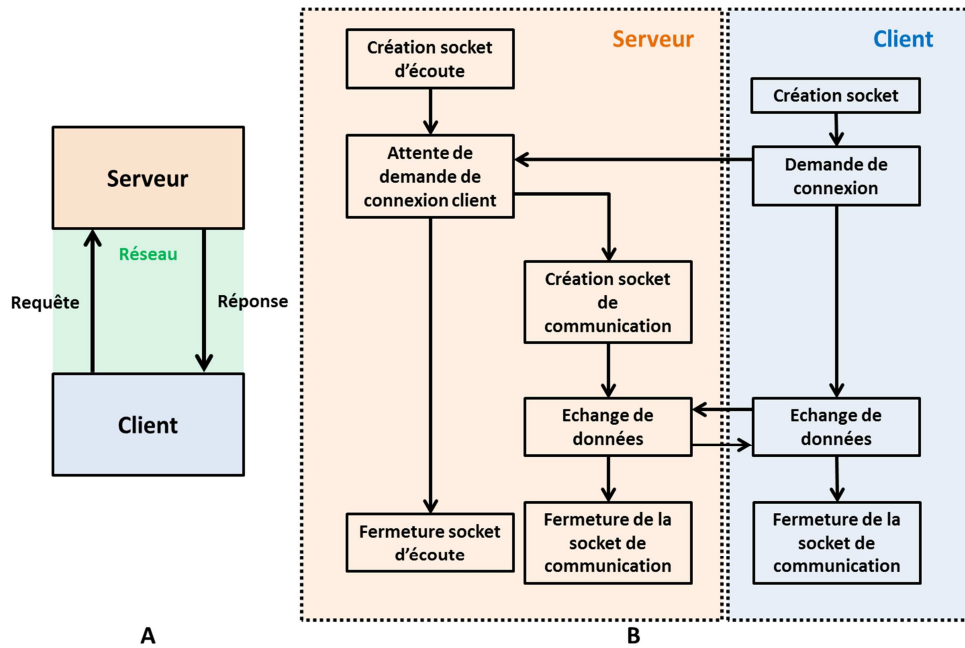


Figure III-2 : A. Schéma de principe de l'environnement client-serveur. B. Principe d'utilisation des socket pour créer un environnement client-serveur.

III-1.3. Mise en place de la transmission d'images en temps réel

III-3.1.a) Interception des données sur la console IRM

La transmission des images doit démarrer lorsque leur acquisition commence. C'est donc le démarrage d'une séquence IRM qui détermine l'établissement d'une connexion entre le scanner IRM et la console distante de pilotage des ultrasons. Aussi, nous avons décidé de définir la console IRM comme le client, et la console de pilotage des ultrasons comme le serveur.

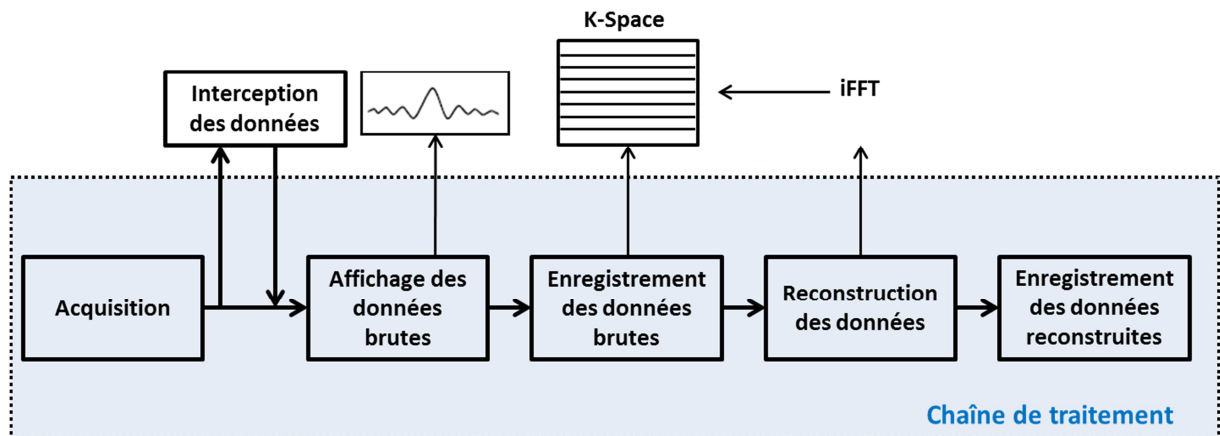


Figure III-3 : Représentation schématique de la chaîne d'acquisition des données avec le logiciel ParaVision 5.

L'acquisition des données sur le scanner IRM que nous avons utilisé se fait via le logiciel Paravision® 5 (Brüker, Allemagne). Cette acquisition se fait grâce à une chaîne de traitement schématisée sur la figure III-3, ce qui permet d'effectuer en parallèle différentes opérations sur les données (acquisition, reconstruction, enregistrement, ...) afin de minimiser le temps nécessaire à une

acquisition et à sa reconstruction. Le constructeur offre la possibilité d'ajouter des filtres (« pipeline filter ») sur cette chaîne de traitement, qui permettent d'intercepter et de modifier les données brutes avant qu'elles ne soient traitées par le logiciel. Nous avons donc utilisé cette option pour pouvoir récupérer les données brutes en temps réel. Ces filtres doivent être écrits en langage C, c'est donc celui que nous avons retenu pour réaliser notre application client.

III-3.1.b) Envoi d'images vers ThermoGuide : transmission image par image

Une première version d'un filtre permettant une transmission des images vers le logiciel ThermoGuide avait été développée avant ma thèse par Frédéric Salabartan et Sébastien Mériaux. Au cours de mon projet, le code a été amélioré par Frédéric Salabartan et j'ai pu le valider en conditions réelles à NeuroSpin. Aussi, nous ne décrivons que brièvement son principe. Il repose sur une transmission des données image par image.

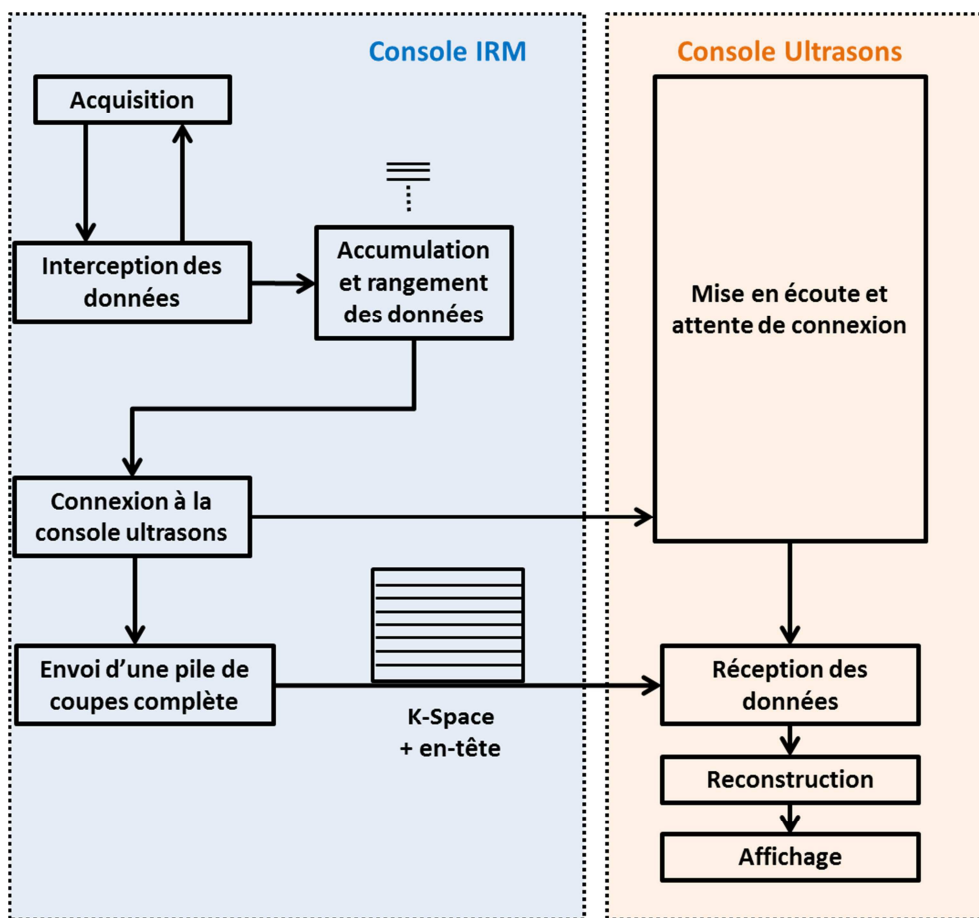


Figure III-4 : Représentation schématique du protocole de transfert temps réel des images vers ThermoGuide.

Les données sont interceptées et accumulées dans un tampon. Lorsqu'une pile complète de coupes a été acquise, une connexion est établie vers le logiciel ThermoGuide et l'ensemble de l'image est transmise puis reconstruite en temps réel.

L'application client intercepte les données au fur et à mesure de leur acquisition. Chaque ligne interceptée est alors stockée dans un tampon où elle est rangée selon sa position dans l'espace de Fourier jusqu'à ce qu'une pile entière de coupes soit acquise. Les données sont alors transmises au logiciel ThermoGuide, accompagnées d'un en-tête incluant toutes les informations nécessaires à la reconstruction des images. L'application serveur est intégrée au logiciel ThermoGuide. Lorsque les

données sont reçues, elles sont alors reconstruites immédiatement grâce à un programme conçu par Frédéric Salabartan et Sébastien Mériaux. Le protocole utilisé est résumé sur la figure III-4. Ce processus prend en charge les séquences de type MSME et FLASH, qui sont celles que nous avons le plus utilisées pour nos applications.

III-3.1.c) Transmission d'image ligne par ligne

Afin de rendre l'outil plus générique pour accepter toutes sortes de séquences (RARE, IR-FGE,...) et pour alléger la partie de calculs faite sur la console IRM lors de la reconstruction, j'ai mis en place un autre protocole de transfert des images. Le cahier des charges que nous nous sommes fixé était d'envoyer les données non plus lorsqu'elles étaient intégralement acquises, mais au fur et à mesure de leur échantillonnage, ce qui nécessite un espace mémoire moins important (plus de nécessité de stocker une pile de coupe entière dans un tampon). L'application client s'inspire du code présenté au paragraphe précédent, tandis que j'ai entièrement développé l'application serveur.

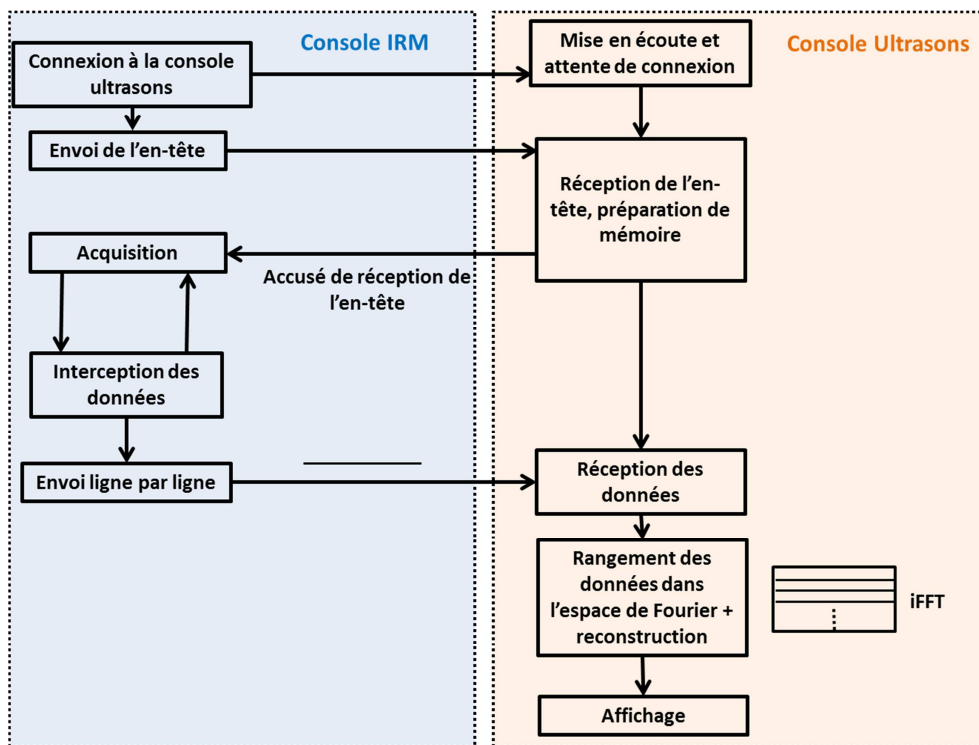


Figure III-5 : Représentation schématique du transfert des données en temps réel. Préalablement à l'acquisition un en-tête est transmis vers l'application distante. Ceci permet de configurer la reconstruction et de réserver la mémoire nécessaire. Lorsque cette étape est réalisée, l'application distante transmet un signal au scanner IRM permettant de démarrer l'acquisition. Les données sont alors transmises au fur et à mesure de leur arrivée à l'application distante.

Dans ce deuxième protocole, un en-tête dont la taille et les propriétés ont été fixées est envoyé par le client (scanner IRM) au serveur (ordinateur distant) préalablement à l'acquisition des images. Il contient les différentes informations nécessaires à la reconstruction des images, mais également la taille des données qui vont être reçues ce qui permet d'organiser la mémoire de façon adéquate. Dans un souci de robustesse, l'acquisition des images IRM reste en attente de la bonne réception de l'en-tête par le serveur. Lorsque le serveur accuse réception de l'en-tête, l'acquisition démarre et les données sont alors interceptées au fur et à mesure de leur acquisition, et sont

envoyées au serveur distant à chaque ligne de l'espace de Fourier acquise. Du côté du serveur, ces données sont alors rangées de manière adéquate dans un tampon en leur attribuant leur bonne position dans l'espace de Fourier avant d'être reconstruites. Pour le moment, l'en-tête reçu est écrit dans un fichier texte et les données sont enregistrées au format binaire sur l'ordinateur distant. La figure III-5 résume la chaîne de traitement utilisée.

J'ai validé le bon fonctionnement de ce transfert d'images ligne par ligne en vérifiant, pour différents types de séquence, les deux points suivants :

- La correspondance entre les informations écrites dans le fichier de l'en-tête et les paramètres de la séquence acquise.
- La correspondance entre l'image reconstruite à partir des données brutes reçues sur l'ordinateur distant (grâce aux programmes de reconstruction développés par Sébastien Mériaux sous Matlab®), et l'image reconstruite par le logiciel du scanner IRM.

La reconstruction des images en temps réel n'a pas encore été complètement implémentée pour ce deuxième programme. Nous avons envisagé deux solutions différentes :

- Le code serveur sera intégré à un programme plus vaste de reconstruction des images développé par Sébastien Mériaux à Neurospin
- Nous avons récemment développé avec Valéry Ozenne (équipe de l'IHU Lyric de Bruno Quesson) un code serveur spécifique convertissant les données reçues au format ISMRMRD, afin de profiter des options de reconstruction offertes par le programme Gadgetron et ses utilitaires open source déjà mis en place dans leur équipe.

La finalisation de ces 2 approches est l'une des perspectives de ce chapitre de mon travail.

III-2. Développement d'un programme pour le repositionnement automatique du transducteur

La mise en place de la transmission des images avait pour but de pouvoir suivre l'effet des ultrasons pendant l'intervention. D'autre part, nous avons vu que la position du transducteur était pilotée par le logiciel ThermoGuide. Aussi, en affichant les images ARFI directement dans ce logiciel, notre deuxième motivation était de pouvoir piloter le déplacement des moteurs sur la base de la position de la tache focale donnée par les images ARFI. Le but final de ce développement était de pouvoir choisir la zone à traiter sur la base d'une image anatomique, puis d'obtenir un déplacement automatique du transducteur vers cette position cible grâce à une détection de la tache focale sur les images ARFI.

Nous avons vu préalablement les différentes solutions qu'offrait ThermoGuide pour engendrer le déplacement des moteurs, en particulier la possibilité de réaliser des mouvements de façon incrémentale. Ainsi, pour les premières expériences que j'ai réalisées, il s'agissait de mesurer manuellement sur la console IRM la distance séparant la tache focale visible sur les images ARFI et la zone du cerveau ciblée. Cette distance était ensuite entrée dans ThermoGuide, et le mouvement correspondant effectué. Bien que le mouvement soit rapide, l'étape de mesure manuelle est

relativement longue. Nous nous sommes donc fixé pour but de réaliser un programme permettant dans une première phase de pointer la zone à cibler sur une image anatomique, puis de mesurer automatiquement la position actuelle de la tache focale sur les images ARFI et enfin de déplacer les moteurs automatiquement pour aller sur la zone cible.

Le logiciel ThermoGuide offre la possibilité de créer des plugins en langage C++, qui permettent d'effectuer un certain nombre d'opérations sur les images reçues. En outre, le fonctionnement des moteurs peut également être piloté depuis ces plugins. J'ai donc programmé un plugin dédié à la réalisation des opérations décrites ci-dessus, en collaboration avec Pierre Bour. La première étape consiste à définir la position ciblée sur une coupe anatomique T_2 affichée sous ThermoGuide grâce à un clic de souris. Afin d'utiliser le même repère pour les différentes images, ses coordonnées en pixel sont converties en mm dans le repère de l'IRM puis enregistrées dans un fichier texte. Lorsque l'image ARFI est reçue, la position de la tache focale est également pointée à l'aide de la souris (plus tard elle sera détectée automatiquement, voir le paragraphe III-3 à ce sujet) et ses coordonnées enregistrées dans le repère du scanner IRM. Une différence entre les deux positions est ensuite effectuée, et le déplacement correctif correspondant est commandé aux moteurs afin que le transducteur atteigne la position cible définie. Un exemple est présenté sur la figure III-6.

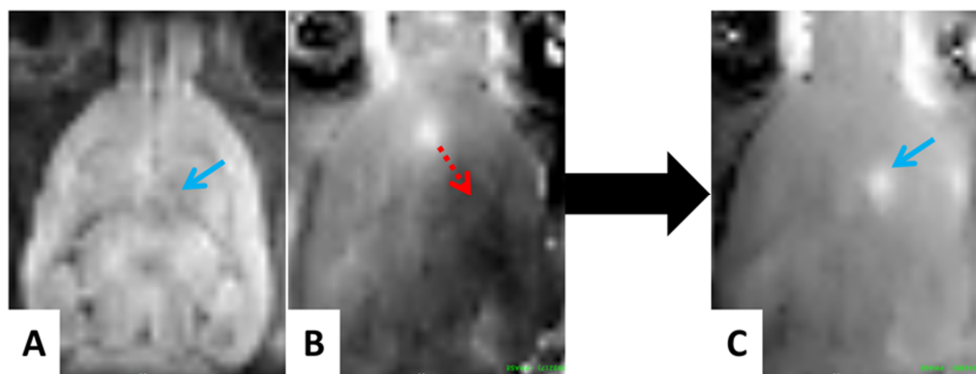


Figure III-6 : Déplacement automatique du transducteur. A. Choix de la zone cible sur une image anatomique grâce à un clic de souris (flèche bleue). B. La position de la tache focale est pointée à l'aide de la souris sur une Image ARFI, puis les moteurs déplacent le transducteur vers la position ciblée (flèche pointillée rouge). C. Une image ARFI permet de vérifier que la position cible a été atteinte.

Cette première version de plugin semi-automatisé nous a permis de mettre en place les bases d'un programme plus abouti. En effet, il a permis de vérifier que les coordonnées étaient correctement calculées, et que les instructions données aux moteurs permettaient d'atteindre la zone ciblée.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à utiliser ce même schéma, mais en ajoutant la détection automatique de la position de la tache focale sur les images ARFI. Le paragraphe suivant présente les méthodes testées pour réaliser cette détection.

III-3. Détection automatique de la tache focale sur les images ARFI

III-3.1. Enjeux et contraintes

La figure III-7 présente plusieurs exemples d'images ARFI affichées après reconstruction sous ThermoGuide. L'enjeu de ce travail était de pouvoir détecter automatiquement la tache focale grâce à un traitement approprié des images.

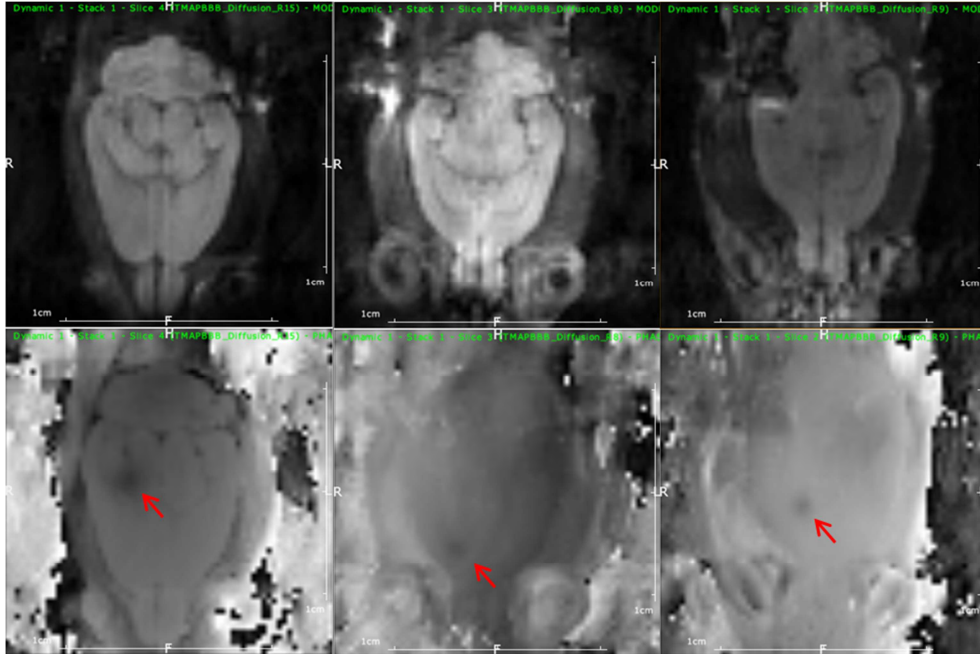


Figure III-7 : Exemples d'images ARFI reçues et reconstruites sous ThermoGuide. La ligne du haut représente les images en amplitude, la ligne du bas représente les images de phase. La flèche rouge indique la tache focale à détecter automatiquement.

En cuve, la pression acoustique au point focal présente un profil spatial gaussien 3D. Nous avons fait l'hypothèse que ce profil était conservé dans le cerveau, ce qui a pour implication que la phase des images ARFI au niveau de la tache focale suit également un profil gaussien. Afin de détecter automatiquement cette tache focale, nous avons donc décidé d'ajuster un profil gaussien sur les images de phase.

On peut néanmoins noter sur la figure III-7 que les images sont particulièrement bruitées. D'autre part, seul un nombre réduit de pixels définit la tache focale ce qui limite le nombre de données disponibles et rend l'ajustement délicat. Ainsi, afin d'éviter l'existence de faux positifs et de réduire la taille de la région à explorer, nous avons décidé dans un premier temps de segmenter le cerveau. L'ajustement du profil gaussien se fait ensuite à l'intérieur du masque obtenu.

Afin que le programme soit le plus portable possible, je me suis donné comme contrainte d'utiliser aussi peu de bibliothèques externes que possible. La deuxième contrainte était de créer une chaîne de traitement d'images ne demandant pas un temps de calcul trop important, c'est-à-dire utilisant des algorithmes peu complexes.

Nous présentons d'abord les stratégies adoptées pour créer un masque robuste du cerveau puis nous expliquons les stratégies mises en œuvre pour détecter la tache focale au sein de ce masque.

III-3.2. Masquage robuste du cerveau

III-2.3.a) Masque sur la base des images d'amplitude : l'algorithme d'Otsu

Le principe de la segmentation est de chercher une ou des propriétés qui permettent de ranger les voxels dans différentes classes. Pour le cas qui nous intéresse, il s'agissait de trouver une propriété qui soit commune à tous les voxels représentant le cerveau, mais excluant les autres voxels.

Lorsque l'on réalise la segmentation d'images IRM, il est courant d'utiliser comme critère l'intensité des voxels. En effet, les séquences sont généralement optimisées pour que le contraste de la zone d'intérêt soit différent du reste de l'image. Dans le cas d'une séquence ARFI, on peut en particulier observer sur l'image de magnitude que le cerveau est plus intense que le fond de l'image.

Cette propriété est visible sur l'histogramme de l'image (figure III-8). Afin de faciliter la construction de cet histogramme, les valeurs des pixels des images d'amplitude ont été normalisées sur une échelle de valeurs discrètes étalées entre 0 et 255. La figure III-8 montre l'exemple d'une image de magnitude ARFI ainsi normalisée et son histogramme. On note sur l'histogramme que deux pics se distinguent, correspondant chacun aux distributions des valeurs des pixels au sein de deux classes différentes:

- Une classe de pixels de valeurs plus faibles qui correspond au fond de l'image, plus sombre.
- Une classe de pixels de valeur plus importante qui correspond au cerveau, plus clair.

Dans ce cas précis, séparer les deux classes revient donc à un problème de seuillage, puisqu'il s'agit de trouver la valeur t de niveau de gris qui sépare correctement les deux classes.

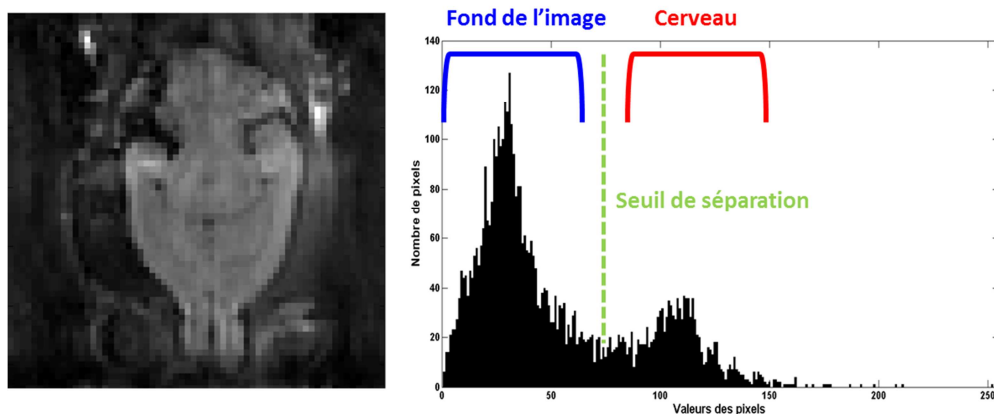


Figure III-8 : Image d'amplitude d'une séquence ARFI et histogramme correspondant. On voit se distinguer sur l'histogramme deux classes de pixels différentes en fonction de leur intensité. Les faibles valeurs correspondent au fond de l'image, les valeurs plus élevées correspondent au cerveau.

Afin de déterminer ce seuil de façon automatique, j'ai choisi d'implémenter la méthode d'Otsu (OTSU 1979) sur les images d'amplitude des acquisitions ARFI. L'algorithme de base fait l'hypothèse qu'il n'existe que deux classes de pixels C_0 et C_1 et est décrit en annexe A.

Tous les pixels de valeur inférieure à ce seuil sont considérés comme le fond de l'image, les pixels de valeur supérieure étant considérés comme appartenant au cerveau. La figure III-9 montre le résultat obtenu avec cette méthode de segmentation pour différentes coupes d'une image. On peut noter que le seuil déterminé par cette méthode permet effectivement de bien dissocier le cerveau du reste de l'image, puisque l'on reconnaît bien la forme du cerveau sur les images binaires générées. On observe néanmoins que des pixels extérieurs au cerveau ont été conservés. En effet, comme nous l'avons expliqué ce type de segmentation tient uniquement compte des valeurs de chacun des pixels. Ainsi des pixels extérieurs à la région d'intérêt mais présentant des valeurs supérieures au seuil calculé sont considérés comme appartenant à la même classe. Comme nous le voyons sur cette illustration, ceci est problématique lorsque les images sont bruitées et que les deux classes ne sont pas clairement séparées. Afin de rendre cette segmentation plus robuste, nous avons décidé d'ajouter à ces informations d'intensité des informations de connectivité qui prennent en compte le voisinage de chaque pixel.

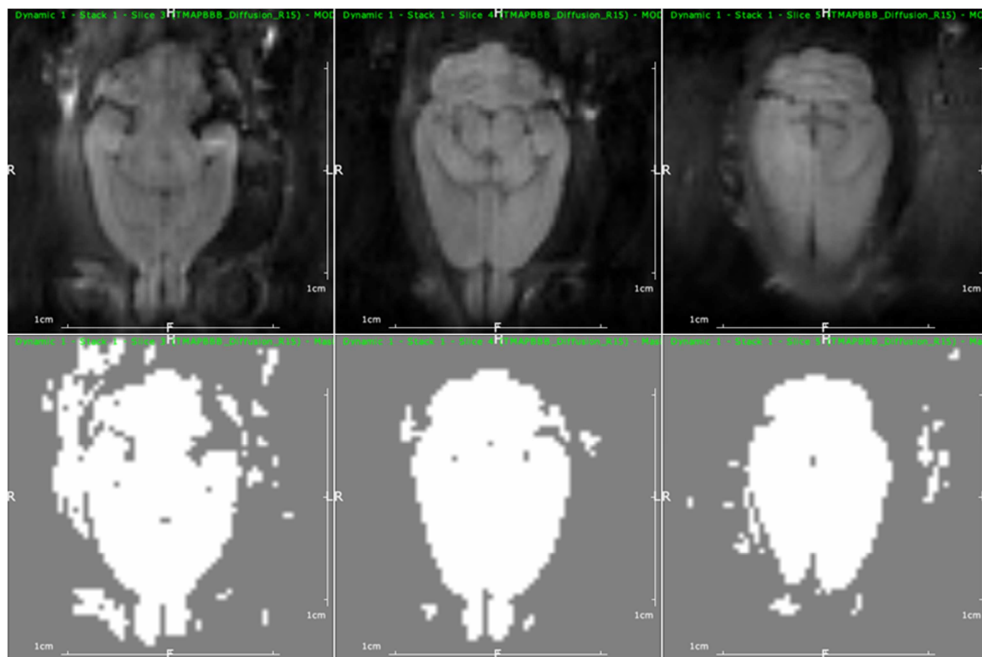


Figure III-9 : La première ligne représente différentes images d'amplitude, et la deuxième ligne représente les masques réalisés en utilisant le seuil calculé par la méthode d'Otsu.

III-2.3.b) Masque sur la base des images de phase : exploitation de la continuité de la phase

En l'absence de perturbations, des spins situés dans le même environnement seront en phase au moment de l'acquisition, ce qui se traduira par un signal uniforme sur l'image de phase.. En pratique, cette propriété n'est pas tout à fait vérifiée, en particulier à cause des petites inhomogénéités des tissus (artéfacts de susceptibilité dus à la présence d'air ou de fer (sang) induisant même après shimming des variations spatiales basse fréquence de la fréquence de Larmor)

ou des variations locales de température. Néanmoins, au niveau local, la variation de phase est quasiment nulle, et cette variation se fait de manière continue. Ainsi, en l'absence de perturbation locale, on observe une phase dite « plate » au sein du cerveau, c'est-à-dire variant peu et continument.

Lorsque l'on change de tissu, cette variation est marquée par une discontinuité. D'autre part, la phase enregistrée à l'extérieur des tissus dans l'air est aléatoire, donc complètement discontinue. Ceci constitue donc un critère de discrimination entre la tête, et l'extérieur de la tête. On peut alors l'exploiter pour segmenter les tissus cérébraux. Notons que contrairement à la méthode de seuillage précédemment présentée, cette technique prend en compte des informations de connectivité puisque l'on s'intéresse à une variation de phase « de voisin à voisin ».

Les algorithmes de déroulement de phase utilisent régulièrement ce type d'informations de continuité. Ainsi, il est courant d'établir en amont du déroulement une carte de qualité de la phase qui mesure cette continuité afin de guider le processus de déroulement (Zhao et al. 2011). Différentes méthodes sont donc disponibles, j'ai choisi d'implémenter la technique des cartes de pseudo-corrélation. Il s'agit d'estimer en tout point l'homogénéité locale de la phase grâce à la formule suivante :

$$|Q_{m,n}| = \frac{\sqrt{(\sum \cos \varphi_{i,j})^2 + (\sum \sin \varphi_{i,j})^2}}{k^2} \quad (\text{III.1})$$

La valeur $Q_{m,n}$ est calculée en chaque pixel (m, n) , en réalisant les sommes de sinus et cosinus sur les $k \times k$ plus proches voisins. $\varphi_{i,j}$ représentent les valeurs de la phase de l'image aux pixels (i, j) . J'ai choisi de ne considérer que les 4 plus proches voisins. Les valeurs de Q sont comprises entre 0 et 1, une valeur de 1 signifiant que la phase est égale sur tous les pixels considérés, donc parfaitement homogène. Une fois la carte de qualité estimée, il faut établir un seuil de qualité permettant de discriminer correctement le cerveau du reste de l'image.

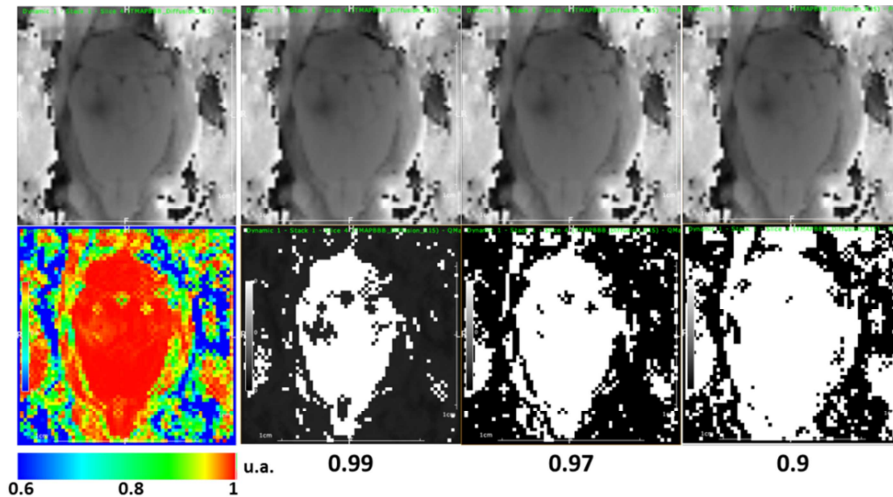


Figure III-10 : La première ligne représente la même image de phase. Sur la deuxième ligne, la première image représente la carte de qualité calculée par pseudo-corrélation, et les images suivantes présentent les masques obtenues pour différentes valeurs de seuil sur la carte de qualité.

Ce seuil a été estimé de façon empirique en testant plusieurs valeurs. La figure III-10 présente la carte de qualité calculée pour une image de phase, puis les images binaires obtenues pour différentes valeurs de seuil de qualité. On observe effectivement que les valeurs sont proches de 1 dans les tissus cérébraux, et plus faibles en dehors du cerveau. On note néanmoins sur les différentes binarisations qu'il existe des zones de continuité à l'extérieur du cerveau également. Afin de discriminer au mieux, j'ai choisi un seuil de 0,98. On observe dans ces conditions des trous au sein du cerveau, notamment au niveau de la tache focale, ce qui s'explique par les variations de phase abruptes rencontrées à cet endroit du fait de l'application des ultrasons.

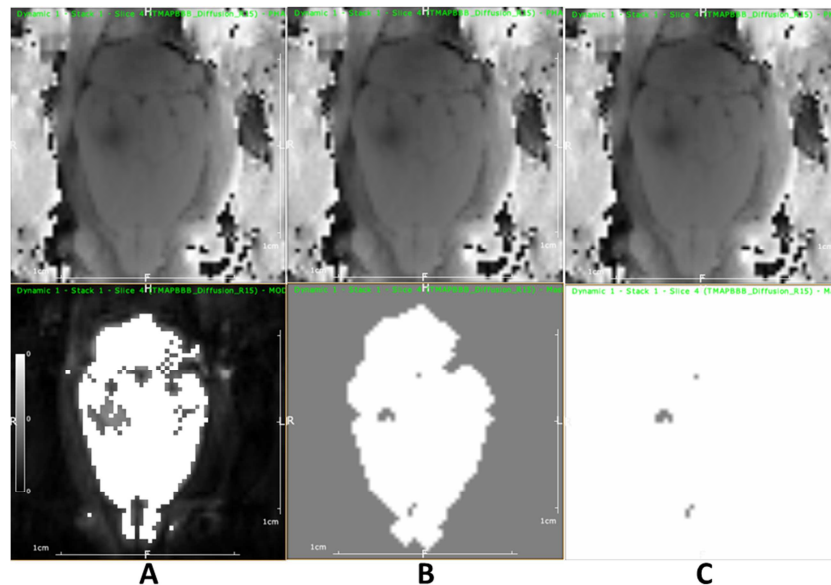


Figure III-11 : A. Masque obtenu par intersection des masques réalisés avec la méthode d'Otsu et la carte de qualité de la phase. B. Le même masque après fermeture et dilatation morphologique. C. Négatif du masque obtenu par croissance de région.

Afin de combiner les avantages des deux techniques présentées, j'ai choisi pour la segmentation finale d'appliquer les deux méthodes conjointement. Le masque résultant est obtenu en réalisant l'intersection des deux images binaires. Un exemple de résultat obtenu est présenté sur la figure III-11.A. On note que les pixels restants sont quasiment tous situés à l'intérieur du cerveau. On peut néanmoins remarquer qu'il existe des zones au milieu du cerveau qui ne sont toujours pas prises en compte par le masque. Ces zones correspondent aux trous observés sur les masques issus des cartes de qualité de la phase, en présence de variations abruptes de la phase (tache focale notamment).

Afin de combler ces zones, j'ai d'abord implémenté une fermeture morphologique suivie d'une dilatation, avec comme élément structurant la boule élémentaire de taille 1 (une croix d'un pixel et ses 4 plus proches voisins), dont le résultat est visible sur la figure III-11.B. Ceci permet de « fermer » le masque, en connectant tous les bords du cerveau. Afin de combler définitivement les trous restant, en particulier au niveau de la région intéressante de la tache focale, j'ai utilisé la technique suivante. Partant du masque obtenu précédemment, l'espace extérieur est comblé à l'aide d'un algorithme de croissance de régions. Le résultat est visible sur la figure III-11.C, on obtient une image binaire dans laquelle les seuls pixels à 0 sont ceux appartenant aux trous à l'intérieur du cerveau. En effectuant ensuite une somme des deux images telle que si deux pixels ont la même

valeur, on attribue la valeur 1 sur l'image finale correspondante, et 0 sinon, on obtient alors bien un masque uniquement sur le cerveau, cette dernière opération permettant à la fois de combler les trous dans le cerveau, mais également de supprimer les éventuels pixels restants à l'extérieur des tissus cérébraux. Les images obtenues à l'issue du traitement complet sont visibles sur la figure III-12. On constate que le masque obtenu couvre bien l'intégralité du cerveau. On peut néanmoins noter sur une des images (figure III-12.A) que la segmentation ainsi obtenu n'est pas parfaite. Afin de valider ce traitement, il a été répété sur plusieurs jeux de données. J'ai estimé dans un premier temps que ces résultats étaient suffisants pour les applications envisagées.

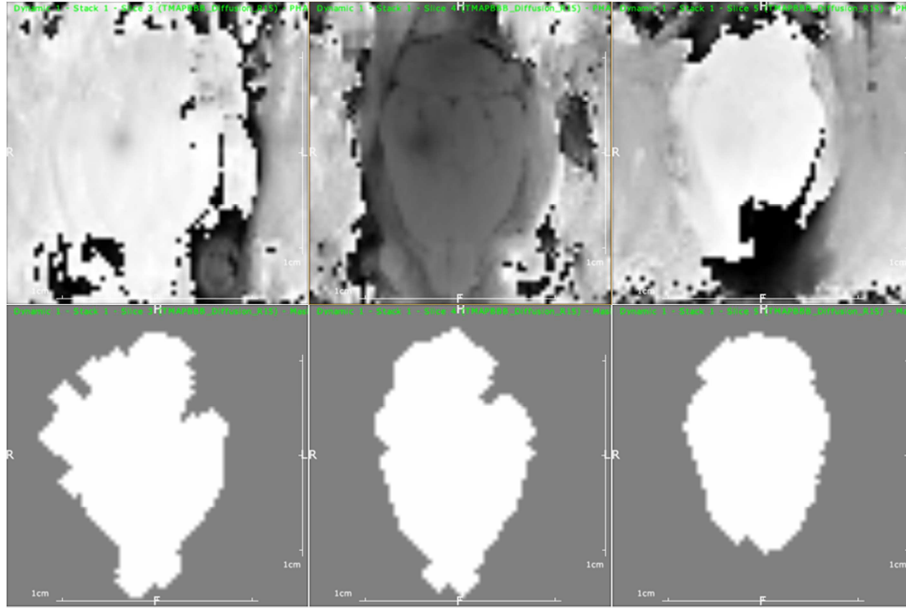


Figure III-12 : Masque final obtenu à l'issue des différents traitements présentés.

III-3.3. Solution envisagées pour la détection automatique de la tache focale

III-3.3.a) Ajustement d'une fonction gaussienne

Une fois le masque établi, nous avons cherché à détecter de façon automatique la tache focale à l'intérieur de ce masque. La première solution retenue a été d'ajuster cette tache focale par une distribution gaussienne en 2 dimensions de la forme suivante :

$$z_{i,j} = A \exp[-(a(i - i_0)^2 + b(j - j_0)^2)] \quad (\text{III.2})$$

$Z_{i,j}$ représente la valeur du pixel de coordonnées (i, j) , et les paramètres à ajuster sont A , a , b , et i_0 et j_0 les coordonnées du centre de la gaussienne, qui sont les paramètres d'intérêt dans notre cas. Réaliser cet ajustement permet notamment d'affiner la connaissance de la position de ce centre, nous ne tenons pas compte pour le moment des autres paramètres dans le résultat final.

Pour réaliser cet ajustement, j'ai utilisé la librairie ALGLIB, qui possède l'avantage de pouvoir être intégrée au programme et ainsi compilée directement dans l'exécutable final, ce qui rend le programme plus aisé à distribuer. Les fonctions d'ajustement choisies sont basées sur la méthode de Levenberg-Marquardt.

Comme dans la majorité des problèmes d'ajustement, une des parties critiques consiste à déterminer les conditions initiales, c'est-à-dire dans ce cas à estimer grossièrement la position de la tache focale. Nous avons vu dans la partie introductive que la phase au niveau de la tache focale était modifiée par rapport à la phase de spins environnants, ce qui résulte généralement en un hyper signal sur l'image de phase. La première solution que nous avons retenue pour déterminer les conditions initiales était alors de réaliser une simple recherche de maximum à l'intérieur du masque, ce qui permet de déterminer des valeurs initiales pour A , i_0 et j_0 . Les valeurs initiales des autres paramètres sont calculées sur les pixels voisins du maximum. L'ajustement permet ensuite de corriger les valeurs de i_0 et de j_0 , et le bon déroulement de cet ajustement permet de confirmer que la position déterminée est bien celle de la tache focale. Cette technique de recherche de maximum a effectivement montré son efficacité dans le cas d'images peu bruitées, pour lesquelles la tache focale ressort clairement du fond de l'image. Elle présente néanmoins un certain nombre de limites majeures :

- Elle ne prend en compte que les cas où l'application des ultrasons induit une variation négative, ce qui la rend dépendante de l'implémentation de la séquence ARFI.
- Cette technique implique d'utiliser une image peu bruitée. En effet, s'il existe un maximum local situé sur une autre partie de l'image, il sera pris en compte pour calculer les conditions initiales, et l'algorithme d'ajustement ne converge pas, ou bien converge vers de mauvais paramètres.

III-3.3.b) Calcul du gradient

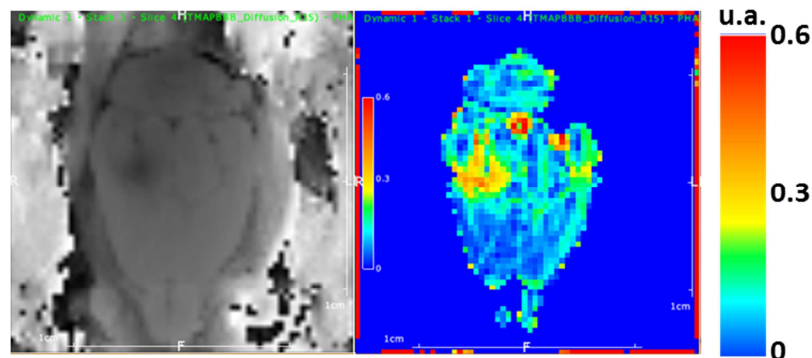


Figure III-13 : Image de phase ARFI et gradient calculés par une convolution avec un filtre de Sobel.

Pour répondre au premier problème, nous avons envisagé d'étendre la recherche non plus seulement à un maximum local mais à un extremum local. Comme nous l'avons rappelé, la phase de l'image varie peu et de façon continue à l'intérieur du cerveau. Au contraire, elle varie assez fortement au niveau de la tache focale. On peut alors calculer le gradient de l'image, puis rechercher ses valeurs les plus élevées qui correspondent à une forte variation locale des valeurs des pixels, comme c'est le cas au niveau de la tache focale. On cherche ensuite dans les zones de variations les plus fortes un minimum local du gradient, qui signe la présence d'un extremum local d'intensité. Pour le calcul du gradient, j'ai implémenté la méthode de Sobel qui fournit une bonne approximation du gradient, tout en étant relativement simple et rapide à calculer. Il s'agit tout d'abord de calculer

en chaque pixel la valeur du gradient horizontal G_x et vertical G_y à l'aide d'une convolution de l'image par les matrices suivantes :

$$x: \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \text{ et } y: \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix}$$

On calcule ensuite en chaque point une estimation de la norme du gradient G à l'aide de la formule suivante :

$$|G| = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} \quad (\text{III.3})$$

Un exemple des gradients obtenus est visible sur la figure III-13. On note effectivement que la valeur du gradient est plus importante dans la région de la tache focale. Néanmoins il existe d'autres régions au sein du cerveau présentant des valeurs aussi élevées. Cette technique seule ne permet donc pas de discriminer correctement la position des ultrasons.

III-3.3.c) Utilisation de la carte de qualité

Afin de répondre au deuxième problème, je suis parti du constat que sur les images binaires extraites de la qualité de la phase le « trou » le plus étendu se situe au niveau de la tache focale sur les jeux de données que nous avons acquis (figure III-10). En effet, la discontinuité de phase induite par les ultrasons s'étend sur plusieurs pixels tandis que les discontinuités autres sont généralement dues à du bruit et sont peu étendues, de l'ordre de un à deux pixels.

Une première étape consiste donc à éliminer les trous de plus petite taille en appliquant une fermeture morphologique. Malgré ce traitement, certaines images présentaient des trous résiduels dans des zones différentes de la tache focale. J'ai donc envisagé de réaliser un clustering à l'intérieur du masque permettant de détecter et trier les différents trous. Le cluster le plus gros est alors identifié comme celui engendré par les ultrasons. Dans le cas cité, nous ne connaissons pas à l'avance le nombre de cluster à extraire. On ne peut alors pas envisager l'utilisation d'algorithmes « classiques » tels que les k-moyennes. J'ai donc développé un algorithme dérivé des croissances de régions dont le principe est le suivant :

- la première étape consiste à générer une image binaire telle que tous les pixels aient pour valeur 1, hormis les pixels appartenant au masque du cerveau et dont la valeur sur la carte de qualité est inférieure au seuil fixé.
- les pixels de cette image sont alors balayés jusqu'à trouver le premier pixel nul.
- il sera le germe permettant la croissance de région dans le premier cluster, le critère d'appartenance étant la valeur nulle d'un pixel.
- lorsque tous les pixels du premier cluster ont été balayés et trouvés, on recherche le prochain pixel nul. Il sera le germe du deuxième cluster.
- le processus est répété jusqu'à avoir parcouru tous les pixels de l'image.

On obtient alors une liste de clusters, dont on calcule la taille. Le cluster de taille la plus importante est considéré comme l'emplacement de la tache focale. Un exemple de résultat de cet algorithme de clustering est visible sur la figure III-14. On observe que les pixels ont été correctement

classifiés, et que la classe de taille la plus importante est bien celle située dans la zone de la tache focale.

Cette méthode permet donc de réduire la région de recherche des conditions initiales à quelques pixels. Afin d'initialiser l'ajustement de la gaussienne, on cherche alors la valeur de gradient minimum à l'intérieur de ce cluster.

Initialement, nous avons décidé de réaliser l'ajustement sur l'ensemble des pixels de l'image de phase contenu dans le cerveau afin de maximiser le nombre de données disponibles. Par ailleurs, aucune contrainte sur les paramètres à ajuster n'avait été rentrée dans l'algorithme d'ajustement. Dans ce cas de figure, même avec des conditions initiales correctes l'algorithme convergeait très peu souvent vers la bonne position. D'autre part, nous avons remarqué que dans ces conditions les paramètres de la gaussienne retournés par l'algorithme étaient souvent très éloignés des données mesurées manuellement (notamment la largeur de la gaussienne à mi-hauteur ainsi que son amplitude).

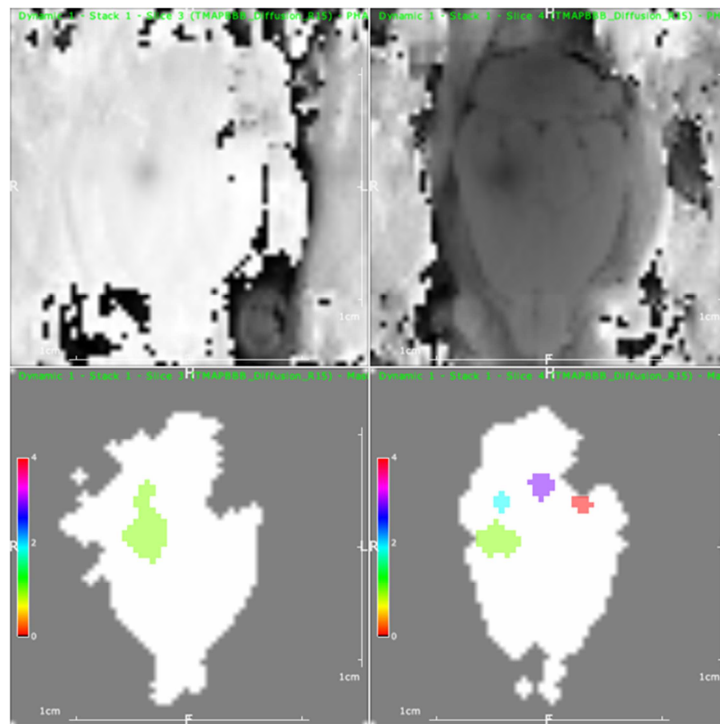


Figure III-14 : Exemple de résultat obtenu avec l'algorithme de clustering décrit. La première ligne représente les images de phase, la deuxième ligne représente le masque utilisé sur lequel sont superposés les différents clusters obtenus. Les clusters de couleur verte sont ceux correspondant à la position de la tache focale. On note qu'ils sont effectivement de taille plus étendue.

Afin de répondre à ces dernières problématiques, nous avons rajouté des contraintes sur les largeurs à mi-hauteur afin qu'elles restent de l'ordre de grandeur des largeurs à mi-hauteur mesurées *in vitro*, ainsi que sur l'amplitude (contrainte entre π et $-\pi$ qui sont les bornes des valeurs des pixels d'une image de phase reconstruites sous ThermoGuide). Enfin, l'ensemble des points pris en compte pour réaliser l'ajustement a été restreint au plus petit rectangle tel que le plus grand cluster trouvé dans l'image soit inscrit dans ce rectangle afin de forcer l'ajustement à se faire autour de la tache focale. Un exemple de résultat obtenu est visible sur la figure III-15.

Afin de d'éprouver la robustesse de cette version, elle a été testée sur un ensemble de 5 jeux de données, de cinq coupes chacun soit 25 images au total (sur l'ensemble des images RSB = 22 ± 7). Nos critères d'évaluation étaient les suivants : le résultat était jugé bon lorsque l'algorithme détectait la tache focale à la bonne position dans le cas où celle-ci était visible, où lorsqu'il ne détectait pas de tache focale lorsque celle-ci n'était pas visible. Nous désignerons par ailleurs comme faux positifs les cas où l'algorithme détecte une tache focale à la mauvaise position, et comme faux négatifs les cas où l'algorithme ne détecte pas une tache focale visible. Nous avons obtenu sur ces données 72% de bons résultats (répartis en 32 % de taches focales détectées, et 40% de non détection en l'absence de tache focale visible), 12% de faux positifs et 16% de faux négatifs. Notons également que pour chacun des jeux de données, au moins une tache focale a été correctement détectée ce qui peut être suffisant pour notre utilisation. Par ailleurs, les faux positifs, qui sont le cas le plus handicapant pour l'application envisagée, sont apparus exclusivement sur des données extrêmement bruitées. Par ailleurs, la précision de la position de la tache obtenue de façon automatique est identique à la précision obtenue manuellement. Cette dernière version s'est donc montrée relativement robuste, bien que des points restent à améliorer, notamment afin d'éliminer la génération de faux positifs.

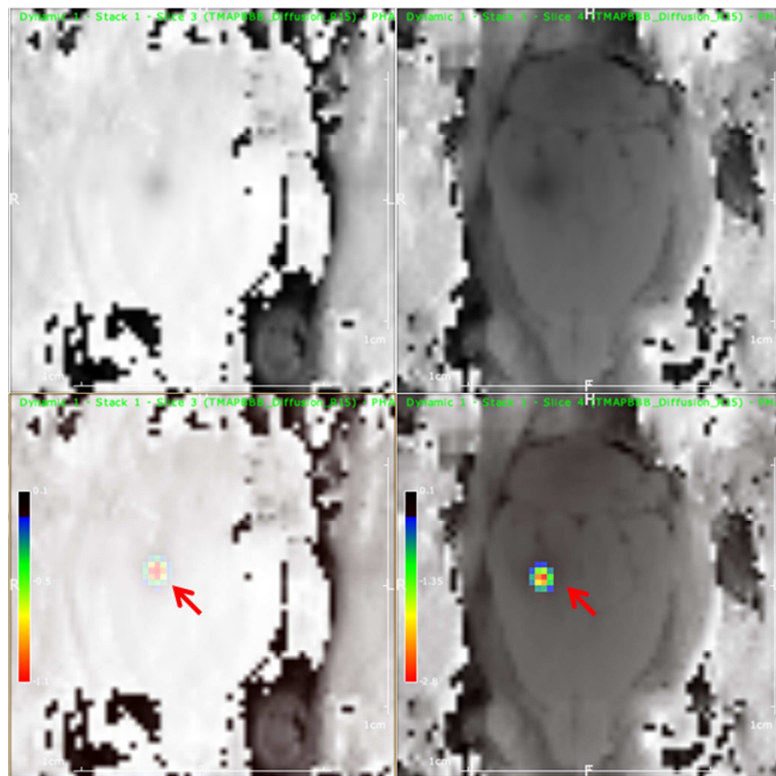


Figure III-15 : La deuxième ligne montre un exemple de gaussiennes (flèches rouges) obtenu à l'issue de la chaîne de traitement. On peut noter qu'elles sont effectivement situées au niveau de la tache focale.

Cette première version n'est donc pas encore complètement aboutie, mais a quand même donné des résultats satisfaisants. Elle devrait être testée sur un nombre plus important de données afin de confirmer sa robustesse. D'autre part, elle n'a pas encore été testée *in vivo* lors d'un protocole complet (seulement offline sur des données réelles *in vivo*), ce qui devrait être réalisé prochainement par l'équipe. Afin de renforcer la robustesse et d'apporter une étape de vérification des faux positifs qui engendreraient un mauvais positionnement du transducteur, une condition supplémentaire a d'ailleurs été rajoutée en vue des tests *in vivo* consistant à s'assurer que le centre

de la tache focale est le même sur au moins deux coupes de la pile. D'autre part, un travail est réalisé parallèlement afin d'améliorer la qualité des images, pour qu'elles soient notamment moins bruitées, ce qui faciliterait grandement la détection de la tache focale.

III-4. Perspectives

Comme nous l'avons rappelé, la tache focale en cuve a la forme d'une gaussienne en 3 dimensions, et nous avons fait l'hypothèse que cette forme était conservée dans le cerveau. Aussi, nous avons présenté dans le paragraphe précédent un code d'ajustement gaussien en deux dimensions du signal ARFI. Afin de raffiner cette première version, nous avons commencé l'implémentation d'un code d'ajustement d'une gaussienne à 3 dimensions. Cet outil pourrait également être utilisé pour les études de diffusion d'agents de contraste présentées au chapitre VI.

Sous l'hypothèse d'une distribution gaussienne 3D, le signal S (dans la gaussienne) est décrit par l'équation suivante :

$$S(\mathbf{x}) = S_0 \exp\left(-\frac{1}{2}(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0)^T \boldsymbol{\Sigma}^{-1}(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0)\right) \quad (\text{III.4})$$

Avec S_0 le signal au centre de la gaussienne, \mathbf{x} les coordonnées du point considéré, \mathbf{x}_0 les coordonnées du centre de la gaussienne et $\boldsymbol{\Sigma}$ la matrice de variance-covariance de cette gaussienne, qui présente la particularité d'être symétrique, définie et positive. En notant :

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \mathbf{x} - \mathbf{x}_0 = \begin{bmatrix} x - x_0 \\ y - y_0 \\ z - z_0 \end{bmatrix} \text{ et } \boldsymbol{\Sigma}^{-1} = \begin{bmatrix} a & d & e \\ d & b & f \\ e & f & c \end{bmatrix}$$

Et en développant l'équation (III.4) le signal s'exprime alors comme :

$$S(\mathbf{x}) = S_0 \exp\left(-\frac{1}{2}[aX^2 + bY^2 + cZ^2 + 2dXY + 2eXZ + 2fYZ]\right) \quad (\text{III.5})$$

Notre approche est alors la suivante :

- Ajuster le signal grâce à l'équation (III.5), avec comme paramètres S_0 , x_0 , y_0 , z_0 , a , b , c , d , e et f
- En déduire la matrice $\boldsymbol{\Sigma}^{-1}$ puis $\boldsymbol{\Sigma}$
- Diagonaliser $\boldsymbol{\Sigma}$. De manière analogue aux calculs réalisés en imagerie du tenseur de diffusion (Basser et al. 1994), les valeurs propres obtenues correspondent aux écarts types selon les axes principaux de la gaussienne, dont les directions sont données par les vecteurs propres issus de cette diagonalisation.

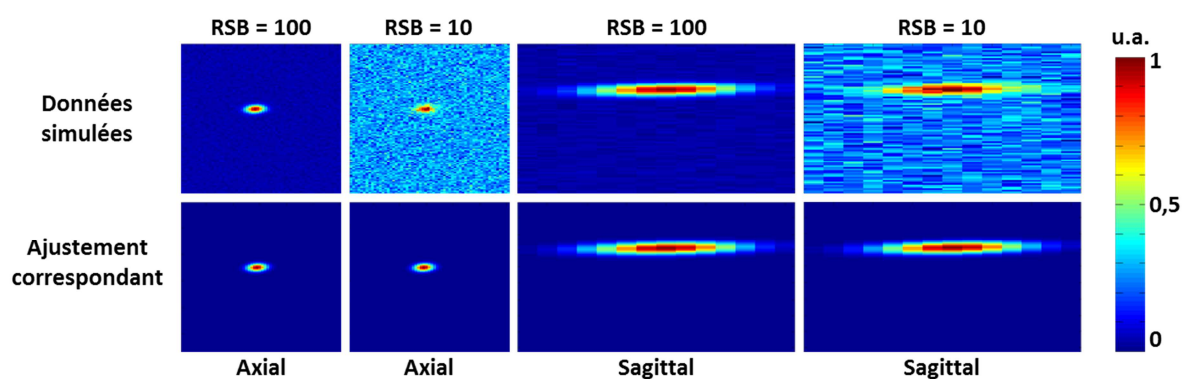


Figure III-16 : Coupes axiales et sagittales de gaussiennes 3D simulées pour différentes valeurs de RSB, et les ajustements correspondants. Axiale désigne une coupe perpendiculaire au plus grand axe, sagittale une coupe parallèle à ce plus grand axe.

Cette approche a d'abord été évaluée *in silico* en ajustant des gaussiennes 3D simulées (figure III-16). Afin de tester la robustesse du code, du bruit a été artificiellement rajouté. La figure III-16 présente une comparaison de données simulées et des données ajustées pour plusieurs valeurs de RSB. D'autre part, pour des valeurs de RSB données nous avons simulé différentes gaussiennes 3D et calculé l'erreur relative entre les écarts type sur les axes principaux (σ_x , σ_y , σ_z) de la gaussienne simulée, et les écarts type de la gaussienne ajustée. Les moyennes de ces erreurs sont présentées dans le tableau III-1. Notons que les gaussiennes ont été simulées avec des paramètres proches de ceux rencontrés *in vivo* (écarts type selon les axes principaux de la gaussienne similaires). On observe que dans ces conditions, la procédure d'ajustement est robuste même pour des niveaux de RSB assez faibles (≈ 10). Pour Cette approche a donné de bons résultats sur des données simulées.

| RSB | Erreur σ_x (%) | Erreur σ_y (%) | Erreur σ_z (%) |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 10⁶ | 3,3 | 1,8 | 1,9 |
| 100 | 3,4 | 1,9 | 1,5 |
| 10 | 3,5 | 2,1 | 3,7 |

Tableau III-1 : Erreurs relatives sur les écarts types selon les axes principaux de la gaussienne pour les données ajustées par rapport aux données simulées.

Néanmoins, les résultats obtenus jusqu'à présent sur des données acquises *in vivo* (ARFI et cartes de concentration, cf chapitre VI) ne sont pas concluants, en particulier à cause de problèmes de convergence dans l'ajustement de la gaussienne. L'hypothèse retenue est celle d'un manque de données le long de l'axe perpendiculaire au transducteur, du fait de l'anisotropie de la séquence d'imagerie utilisée. Cependant, les données simulées dans de telles conditions semblent être correctement ajustées. Les causes du mauvais comportement du code *in vivo* sont donc actuellement en cours d'étude.

III-5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les différents développements logiciels qui ont été effectués durant cette thèse afin d'assister le guidage des ultrasons.

Dans un premier temps, nous avons présenté la mise en place d'un protocole de transfert des images en temps réel via un environnement client-serveur. Ceci nous permet d'avoir au long de l'expérience un affichage des images sur la console de pilotage des ultrasons. Ceci permet à la fois de définir une zone cible sur des images anatomiques, et également de connaître la position des ultrasons grâce aux images ARFI. La combinaison de ces deux informations permet alors de déplacer le transducteur en conséquence.

Enfin nous avons présenté les stratégies mises en place afin de détecter la tache focale sur une image ARFI, avec comme but final l'automatisation du déplacement du transducteur. Nous avons fait part des difficultés rencontrées inhérentes notamment à la qualité des images. Nous avons présenté les méthodes permettant de générer un masque sur le cerveau, puis les techniques de traitement d'images implémentées pour parvenir à déterminer la position de la tache focale au sein de ce masque.

Enfin, nous avons vu un projet en cours d'implémentation visant à réaliser un ajustement de gaussiennes en trois dimensions.

IV. Utilisation du système motorisé *in vivo*

L'objectif de chapitre est de présenter des applications du système motorisé que nous avons développé.

Nous présentons d'abord le protocole général de perméabilisation de la BHE qui sera utilisé au cours des différentes applications. Des expériences visant à valider la motorisation *in vivo* seront ensuite décrites, en montrant la reproductibilité offerte par ce système, ainsi que la possibilité de perméabiliser la BHE selon des trajectoires arbitraires. Nous présentons ensuite des études de l'influence de différents paramètres acoustiques. Enfin nous décrivons le protocole mis en place pour réaliser une perméabilisation sur un hémisphère entier. Nous présentons en perspectives une première expérience de neurostimulation montrant la polyvalence de ce système.

IV-1. Protocole de perméabilisation de la BHE

Les expériences présentées dans ce manuscrit ont été réalisées sur des rats Sprague-Dawley (Janvier, France) en accord avec le comité d'éthique local et dans le cadre d'un protocole accepté par le ministère de la recherche (numéro d'autorisation du projet: 12-058, numéro d'autorisation du site d'expérimentation: B-91-272-01). Toutes les expériences ont été réalisées sous la responsabilité d'une personne titulaire du diplôme d'expérimentation animale niveau 1, que j'ai moi-même obtenu en septembre 2014.

Nous avons choisi d'effectuer toutes les expériences présentées dans ce manuscrit sur des rats. Ce rongeur présente en effet l'avantage d'être résistant, et d'être plus facile à manipuler que des souris du fait de sa taille plus importante, notamment pour certains gestes plus techniques tels que les injections intraveineuses intracaudales. D'autre part, la taille plus importante du cerveau rend plus facile le ciblage de structures spécifiques lors du traitement par ultrasons. Enfin, il est facilement disponible, et sa taille lui permet de pouvoir être imagé dans des scanners précliniques de taille standard.

IV-1.1. Protocole général

Les rats sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (1-2%) dans un mélange d'air et d'oxygène. Dans un premier temps, la tête des animaux est rasée afin de garantir un bon couplage entre le crâne et le transducteur puis ils sont placés sur le lit dans le dispositif de stéréotaxie (figure II-21). Un cathéter de 25 Gauge est introduit dans la veine caudale afin de pouvoir réaliser l'injection de microbulles (depuis l'extérieur de l'aimant dans le cas d'expériences sous IRM). Il est constitué d'un tube de silicone de 0,5 mm de diamètre et d'environ 40 cm, ce qui permet d'obtenir un volume mort limité ($< 100 \mu\text{L}$). Le diamètre de l'aiguille a été choisi de façon à ne pas endommager les microbulles lors de l'injection. Le transducteur est alors couplé au crâne de l'animal grâce à du gel échographique.

Des microbulles SonoVue® (Bracco, Italie) sont injectées dans le cathéter via un bolus ($1,5 \times 10^8$ bulles. mL^{-1} , $1,6 \text{ mL.kg}^{-1}$, 2 s). Les microbulles ayant une durée de vie très courte dans le système sanguin (environ 10 min chez le rat), les tirs ultrasonores sont réalisés immédiatement après

l'injection des microbulles (5 s). Pour les séquences de tirs utilisées, nous faisons la distinction entre deux catégories :

- Les expériences de perméabilisation focale : le transducteur est immobile, les ultrasons sont tirés avec le schéma suivant : 3 ms de tir répétées toutes les 100 ms pendant une minute.
- Les expériences de perméabilisation avec déplacement du transducteur : les trajectoires utilisées seront précisées pour chaque application.

Les valeurs de pression acoustique *in situ* seront précisées pour chaque protocole. Elles ont été calculées à partir des courbes de calibration des transducteurs et des facteurs de transmission des crânes de rats présentés au chapitre II.

IV-1.2. Protocole sous IRM

Lorsque le protocole est réalisé sous IRM, une sonde de température rectale est posée de façon à suivre la température de l'animal au cours de l'expérience, qui est maintenue au plus près de 37 °C grâce à un système d'air chaud soufflé. Un capteur de pression permet également de suivre sa fréquence respiratoire, que l'on maintient entre 40 et 60 respirations par minute par modulation de la quantité d'isoflurane. Le lit est ensuite disposé sur le berceau (figure IV-1). Le transducteur est alors couplé au crâne à l'aide de gel échographique puis l'animal est introduit dans l'aimant.

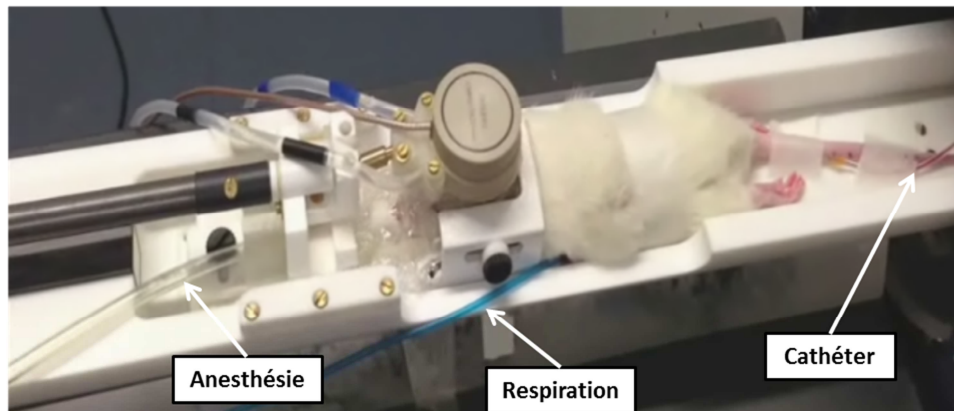


Figure IV-1 : Installation de l'animal sur le lit.

La session d'imagerie se déroule alors selon les étapes suivantes :

- Image anatomique de référence pondérée T_2 (séquence IV-1) : séquence RARE, $TE_{eff} / TR = 30 / 3800$ ms, résolution = $0,250 \times 0,250 \times 0,5$ mm³, matrice = $128 \times 120 \times 32$, facteur RARE = 8, 8 moyennes, durée totale = 7,5 min.
- Image pondérée T_1 de référence (séquence IV-2) : séquence MSME, $TE / TR = 8,3 / 300$ ms, résolution = $0,125 \times 0,125 \times 1$ mm³, matrice = $256 \times 256 \times 10$, 10 moyennes, durée totale = 6,5 min.
- Vérification de la position de la tache focale avec une image ARFI (séquence IV-3) : séquence MSME, $TE / TR = 28 / 1080$ ms, résolution = $0,5 \times 0,5 \times 2$ mm³,

matrice = 64 x 64 x 5, 2 moyennes, durée des MSG = 8 ms, durée des tirs ultrasonores = 4 ms, durée totale = 2,5 min.

- Déplacement du transducteur avec les moteurs pour atteindre la position cible, puis acquisition d'une image ARFI pour vérifier le bon positionnement de la tache focale.
- Cartographie T_1 de référence (séquence IV-4) : séquence IR-FGE, TE / TR₁ = 2,5 / 5 ms, 6 segments, 60 temps d'inversion, TR₂ = 9 s, résolution = 0,225 x 0,225 x 1 mm³, matrice = 128 x 104 x 14, une moyenne, durée d'acquisition = 12,5 min.
- Perméabilisation de la BHE (cf paragraphe IV-1.1) puis injection d'un agent de contraste via bolus dans le cathéter pour visualiser la perméabilisation. Sauf mention contraire, l'agent utilisé est du Dotarem® (Guerbet, France, 0,5 M, 1,6 mL.kg⁻¹, 2 s).
- Acquisition de séquences pondérées T_1 (séquence IV-2) pour visualiser la perméabilisation, et de cartes paramétriques T_1 (séquence IV-4) pour quantifier la concentration en agent de contraste.
- Acquisition d'une séquence pondérée T_2 (séquence IV-1) pour vérifier l'absence d'oedèmes ou d'hémorragies.

L'ensemble de la procédure est résumé sur la figure IV-2.

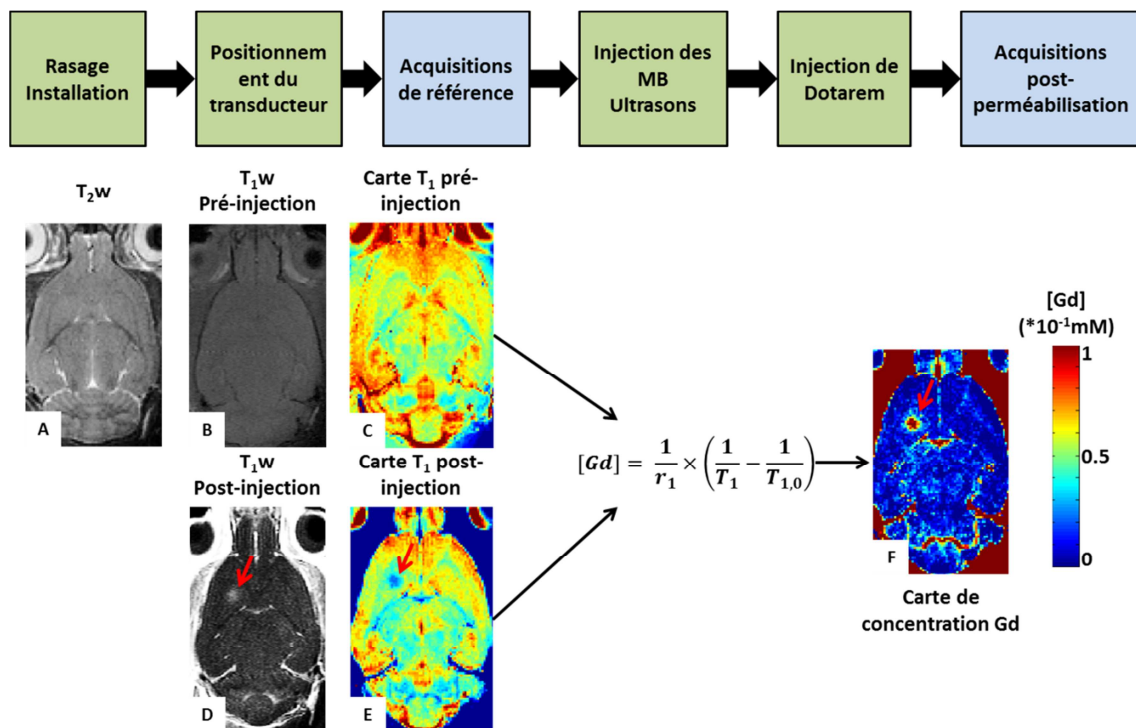


Figure IV-2 : Protocole de perméabilisation de la BHE sous IRM.

IV-2. Validation de la motorisation *in vivo*

La motivation première du développement de ce système d'ultrasons motorisé était de pouvoir réaliser des expériences de perméabilisation de la BHE. J'ai donc validé la motorisation *in vivo* pour cette application.

Dans un premier temps, j'ai cherché à cibler la même zone anatomique chez des animaux différents afin de tester la reproductibilité du déplacement des moteurs. Dans un deuxième temps, j'ai prouvé la possibilité de perméabiliser la BHE sur des zones étendues choisies de façon arbitraire. Dans ces expériences, j'ai simplement cherché à mettre en évidence la perméabilisation, aussi aucune carte de concentration n'a été acquise.

IV-2.1. Précision et reproductibilité

Le but de cette première expérience était de tester la reproductibilité du positionnement de la tache focale grâce à l'utilisation combinée de l'imagerie ARFI et du système motorisé.

Pour ce faire, j'ai cherché à cibler la même région dans le striatum de 3 rats (130-150 g) différents selon la méthode de positionnement décrite au paragraphe IV-1.2 ci-dessus. Une fois cette position fixée, la perméabilisation a été réalisée de façon focale avec une pression acoustique de 0,6 MPa.

Les images pondérées T_1 pour les trois rats sont présentées sur la figure IV-3. On observe un rehaussement de contraste dû à l'infiltration de Gadolinium dans les zones où la BHE a été perméabilisée.

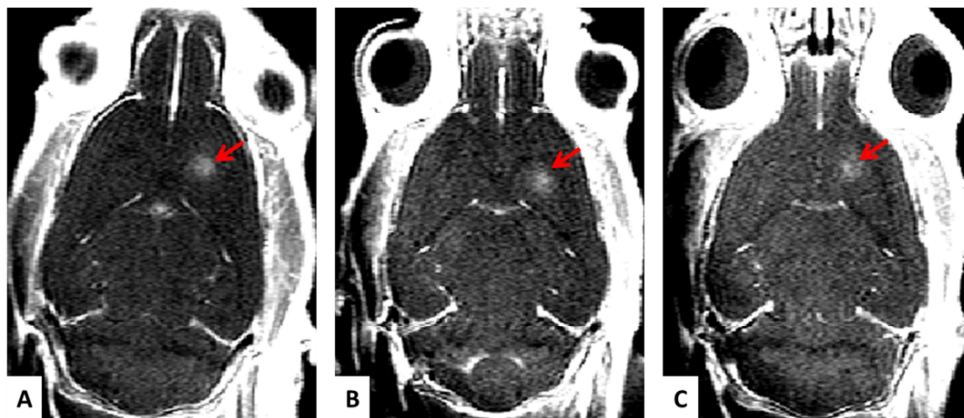


Figure IV-3 : Reproductibilité du positionnement *in vivo*. Les images pondérées T_1 pour trois rats chez lesquelles la même zone dans le striatum a été ciblée. Les flèches rouges montrent le réhaussement de contraste dû à la pénétration de Gd suite à la perméabilisation de la BHE.

Afin d'estimer l'erreur de positionnement commise entre les différentes expériences, nous avons mesuré sur chaque image pondérée T_1 la distance entre le centre de la zone perméabilisée et la fin du bulbe olfactif. En comparant ces distances, la différence maximum notée était de 0,5 mm. Etant donné la résolution de la séquence ARFI utilisée (0,5 mm dans le plan), et la largeur de la tache focale à mi-hauteur (1,2 mm dans un plan perpendiculaire au faisceau ultrasonore), nous pouvons considérer que le positionnement entre ces trois différents rats est reproductible.

Cette expérience montre donc un premier intérêt de ce système motorisé, qui permet de choisir de façon reproductible la zone à perméabiliser et rend donc plus robuste les résultats d'expériences de pharmacologie impliquant des groupes d'animaux.

IV-2.2. Perméabilisation étendue de la BHE selon des trajectoires arbitraires

Dans cette deuxième expérience, j'ai cherché à démontrer qu'il était possible d'utiliser ce système motorisé pour perméabiliser la BHE sur des régions étendues du cerveau choisies arbitrairement.

Des trajectoires définissant les lettres « A », « X » et « E » ont été définies dans ThermoGuide. Trois rats (130-150 g) ont été utilisés. Pour l'exécution de ces trajectoires, les tirs ultrasonores étaient continus et la vitesse de déplacement des moteurs était fixée à 10 mm.s^{-1} , chaque trajectoire étant répétée 60 fois avec 100 ms de pause entre chaque exécution. Cette vitesse et ce duty cycle de 100% ont été choisis de façon à répéter le plus souvent possible la trajectoire pendant la durée de vie des bulles dans le réseau vasculaire tout en ne dépassant pas en tout point de la trajectoire les durées de tir utilisées en ouverture statique (3 ms / 100 ms pendant 1 minute). La position de la tache focale déterminée grâce à l'ARFI avant le protocole de perméabilisation permet de placer le point de départ de la trajectoire à l'endroit souhaité.

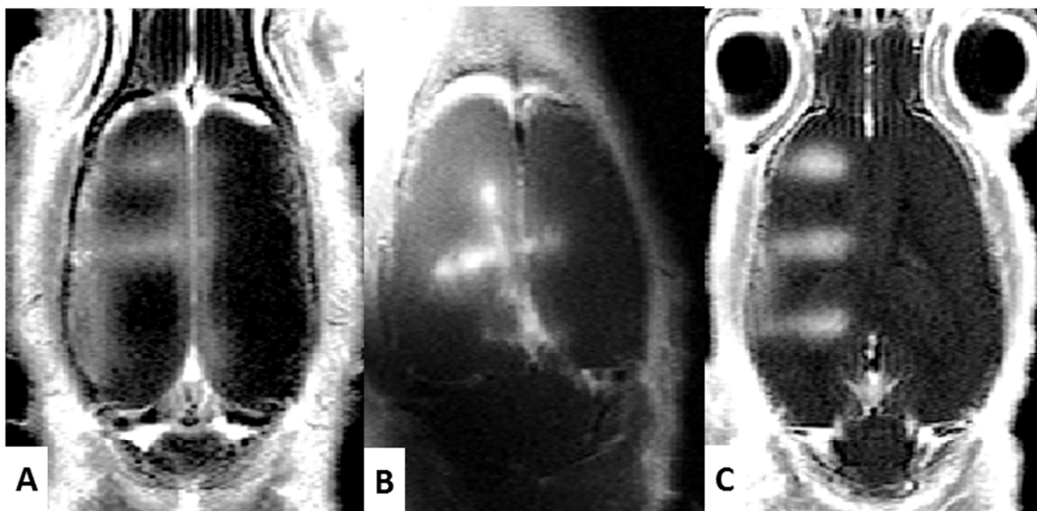


Figure IV-4 : Perméabilisation de la BHE selon des trajectoires arbitraires. A, B et C ont été obtenues après injection de Gd et montre un réhaussement de contraste dans les zones où la BHE a été perméabilisée. On retrouve bien les formes « A », « X » et « E » définies dans ThermoGuide.

Les images pondérées T_1 obtenues 30 minutes après injection de Gd pour ces 3 différents rats sont présentées sur la figure IV-4. Pour chacune des expériences, on observe bien un réhaussement du contraste uniquement le long de la trajectoire définie. Ces images confirment donc que la BHE a bien été perméabilisée selon la forme préalablement choisie. Par ailleurs, aucun dommage n'a été observé sur les images pondérées T_2 acquises à la fin du protocole. On observe aussi des variations d'intensité du réhaussement le long des trajectoires. Celles-ci peuvent être attribuées soit à un meilleur couplage du transducteur avec la tête en certains points, soit à la variation spatiale du facteur de transmission du crâne de rat, soit en une réelle dépendance de l'ouverture en fonction de la région anatomique pour des paramètres acoustiques constants (densité vasculaire et distribution de taille des vaisseaux change selon les structures), soit enfin à une combinaison de ces facteurs.

Afin d'optimiser le protocole de perméabilisation de la BHE avec le transducteur en mouvement, nous avons étudié l'influence de différents paramètres acoustiques dans ces conditions.

IV-3. Etude de l'influence des paramètres acoustiques lors d'une perméabilisation de la BHE selon des trajectoires arbitraires

Comme nous l'avons vu dans le chapitre introductif, de nombreuses équipes ont caractérisé l'effet des différents paramètres acoustiques sur la perméabilisation de la BHE. On peut distinguer parmi ces études deux grands types de protocoles :

- Une perméabilisation focale, pour laquelle le transducteur reste à la même position durant toute la session d'ultrasons.
- Une perméabilisation multi-sites. Dans ce cas, plusieurs perméabilisations sont réalisées de façon focale en différentes localisations dans le cerveau suite à une seule injection de bulles (O'Reilly et al. 2010)(McDannold et al. 2012).

L'utilisation du système motorisé présenté dans le chapitre II fait naître de nouvelles questions et de nouveaux enjeux. En effet, le transducteur étant en mouvement, le faisceau ultrasonore balaye les tissus cérébraux. Ainsi, les conditions acoustiques vécues en un point du cerveau sont différentes de celles engendrées en ce même point lorsque le transducteur est immobile. Les résultats des précédentes études ne sont donc plus forcément transposables.

Le but recherché était d'établir un protocole permettant d'obtenir une perméabilisation sur des régions étendues du cerveau qui n'induisse pas de dommages. Pour ce faire, j'ai cherché à établir l'influence de la pression acoustique lorsque le transducteur est déplacé. L'influence du duty cycle lors d'une perméabilisation de la BHE motorisée a également été testée. Enfin, j'ai réalisé des mesures de variation de température des tissus au cours d'une telle expérience, afin de garantir que ce nouveau protocole n'induisait pas d'échauffement, potentiellement délétère, des tissus cérébraux.

IV-3.1. Influence de la pression acoustique sur la perméabilisation de la BHE

Comme nous l'avons vu dans le chapitre introductif, l'influence de la pression acoustique dans le cas de perméabilisation de la BHE ponctuelle se manifeste par deux effets principaux :

- Il existe un seuil de pression à dépasser pour observer une pénétration accrue de molécules dans le cerveau (seuil d'ouverture).
- Augmenter la pression semble augmenter l'intensité de la perméabilisation jusqu'à un certain point de saturation, puis créer des dommages pour une pression trop importante (seuil de sécurité).

Le but de cette étude était de compléter ces résultats pour le cas d'une perméabilisation réalisée avec un déplacement du transducteur et des tirs continus pendant ce déplacement.

IV-1.3.a) Protocole expérimental

Pour ce protocole, deux rats (120 g) ont été utilisés.

En autorisant un déplacement du transducteur, le système motorisé que nous avons développé permettait de tester plusieurs conditions acoustiques sur un même animal au cours de la même expérience, ce qui a été mis à profit dans cette étude. La perméabilisation est réalisée selon le protocole présenté au paragraphe IV-1.2.

Pour chacun des rats, une trajectoire carrée de 5 mm de côté a été définie. Chacun des côtés du carré présentait une pression acoustique différente: 0,2, 0,4, 0,7 et 0,9 MPa pour le rat #1, 0,9, 1,4, 1,8 et 2,2 MPa pour le rat #2, ces valeurs ayant été calculées avec un facteur de transmission de 0,8 pour des animaux de ce poids. Pour les deux animaux, les tirs ultrasonores ont été effectués continuellement durant le déplacement du transducteur, chaque trajectoire étant répétée 60 fois avec une pause de 100 ms entre chaque répétition, et une vitesse de déplacement de 7 mm.s^{-1} . Le temps total de tir était de 3min. Des schémas des trajectoires utilisées sont présentés sur la figure IV-5.

IV-1.3.b) Résultats

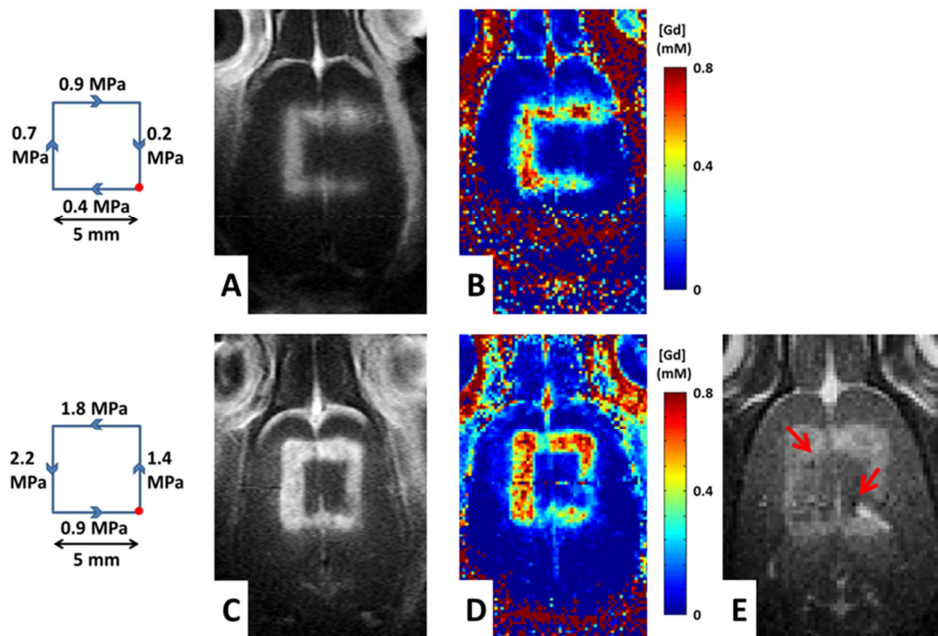


Figure IV-5 : Influence de la pression acoustique sur la perméabilisation de la BHE. A (resp. C) est l'image pondérée T_1 obtenue après injection de Dotarem pour le rat #1 (resp. #2). B (resp. D) représente la carte de concentration en Gd pour le rat #1 (resp. #2). E représente l'image pondérée T_2 obtenue à la fin du protocole pour le rat #2. Les flèches rouges indiquent de potentielles hémorragies.

Les images obtenues sont présentées sur la figure IV-5. Les parties B et D de la figure IV-5 présentent les cartes de concentration obtenues après injection de Dotarem. Le côté pour lequel la pression acoustique était la plus basse (0,2 MPa) ne présente pas d'infiltration de Gd (figure IV-5.A et B). On retrouve donc, de manière similaire à une perméabilisation ponctuelle, l'existence d'un seuil de pression acoustique à dépasser pour observer une délivrance accrue d'agents de contraste au cerveau. On observe que pour une pression de 0,4 MPa, la perméabilisation est efficace. Le seuil d'ouverture se situe donc entre 0,2 et 0,4 MPa ce qui concorde avec des études précédentes de notre équipe en ouverture ponctuelle. Ces expériences seront à compléter par d'autres valeurs de pression pour affiner la valeur de ce seuil. On peut également noter qu'au-delà d'une certaine valeur de pression, la concentration maximum semble être stable et ne plus augmenter. Ceci paraît donc en

accord avec le phénomène de saturation observé dans de précédentes études (Chopra et al. 2010; Hynynen et al. 2005; Treat et al. 2007).

D'autre part, on peut noter sur les images pondérées T_1 (figure IV-5.A et C) que pour chacun des rats les côtés des carrés sont plus larges pour des pressions acoustiques plus élevées. Pour expliquer ce résultat, nous avons évoqué la distribution gaussienne de la pression acoustique au sein de la tache focale. En effet, en supposant que ce profil est conservé *in vivo* ce qui semble être le cas à 1,5 MHz d'après nos images ARFI, si la pression acoustique maximale au point focal (c'est-à-dire l'amplitude de la gaussienne) augmente, alors le seuil de pression acoustique requis pour une perméabilisation sera atteint sur une portion plus large de la tache focale ce qui résultera en une perméabilisation sur une région plus large.

Nous avons également noté que le long d'une même ligne, correspondant à une même pression, la concentration de Dotarem n'est pas parfaitement homogène. Ceci semble confirmer que l'efficacité de la perméabilisation de la BHE est dépendante du tissu considéré (McDannold et al. 2012), en particulier des variations locales de la densité vasculaire et de la distribution de taille des vaisseaux. Ces variations spatiales pourraient également être attribuables à un temps de tir effectif passé dans les coins du carré plus élevé (la tache focale étant légèrement étendue, les coins du carré connaissent un champ acoustique durant les deux segments constituant ce coin). Une autre hypothèse pourrait être la différence de facteur de transmission du crâne de rat en fonction de la région considérée comme nous l'avons vu dans le chapitre II, conduisant à des pressions *in situ* légèrement différentes le long d'une même ligne. Enfin, des hémorragies ont été suspectées sur l'image pondérée T_2 pour la pression acoustique la plus élevée (figure IV-5.E), ce qui pourrait également expliquer les hétérogénéités observées dans la pénétration de Dotarem.

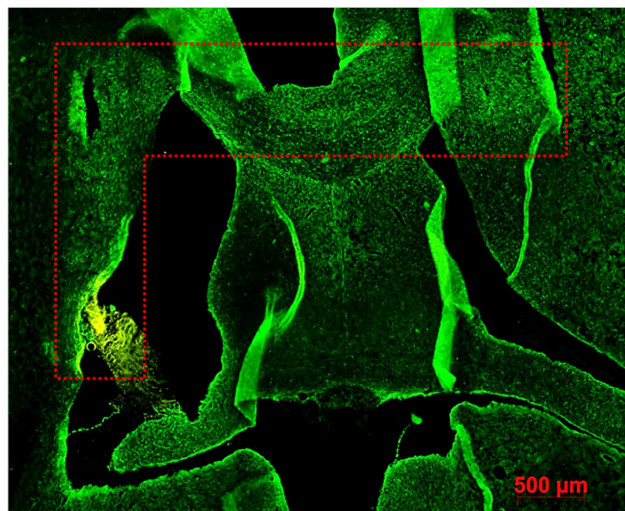


Figure IV-6 : Marquage à la GFAP (vert, 488 nm) pour le rat #1.

Nous avons également procédé à un marquage du cerveau du rat #1, prélevé 24 heures après les ultrasons, à la GFAP à titre préliminaire (se reporter au chapitre V pour le protocole détaillé). Un exemple d'une coupe est visible sur la figure IV-6. On peut déjà observer un marquage le long de la trajectoire, notamment sur les côtés de pression 0,7 et 0,9 MPa, ce qui reflète une activation astrocytaire, signe de neuroinflammation. Ainsi, bien qu'aucun dommage n'ait été observé sur les

images pondérées T_2 pour ce rat, des réactions sont visibles au niveau tissulaire. Ce point fera l'objet d'un travail plus approfondi dans le chapitre V.

Enfin, de manière plus générale, ces résultats montrent que ce système motorisé permet de tester plusieurs conditions acoustiques, sur le même animal et au cours d'une même session, ce qui présente comme avantages :

- Une économie du nombre d'animaux nécessaires.
- Un gain de temps puisqu'ici nous réalisons quatre expériences en une.
- Une comparaison plus juste entre les conditions acoustiques, puisque les autres paramètres physiologiques (température, anesthésie), dont on sait qu'ils influent sur la perméabilisation (McDannold et al. 2011), sont strictement égaux.

IV-3.2. Influence du duty cycle sur la perméabilisation de la BHE

De même que pour l'influence de la pression acoustique, nous avons vu en introduction que des études avaient cherché à démontrer le rôle du duty cycle dans la perméabilisation de la BHE ponctuelle. Cependant, lorsque les tirs sont réalisés durant un mouvement du transducteur, la notion de duty cycle devient alors différente puisque le champ acoustique en un point est continuellement modifié. L'objectif de cette expérience était donc de vérifier l'effet du duty cycle utilisé durant un mouvement du transducteur.

IV-2.3.a) Protocole expérimental

Pour ce protocole, deux rats ont été utilisés (120 g).

Le protocole général est celui présenté au paragraphe IV-1.2. Nous avons défini pour chacun des rats une trajectoire de perméabilisation constituée de deux lignes parallèles de 1 cm de longueur dans la direction rostro-caudale. Sur la première ligne, les tirs ultrasonores sont continus. Sur la deuxième ligne, un duty cycle de 10 % a été utilisé (un tir de 3 ms toutes les 30 ms). Afin que le temps total de tir ultrasonore soit le même en chaque point, la ligne de duty cycle la plus faible a été balayée dix fois plus que la ligne subissant des tirs continus. Nous avons choisi une pression acoustique au point focal de 0,6 MPa, qui d'après l'expérience présentée dans le paragraphe précédent permet d'obtenir une perméabilisation efficace sans entraîner de dommages tissulaires. La vitesse de translation des moteurs est de 10 mm.s^{-1} , et la trajectoire complète (1 passage sur la ligne de gauche puis 10 passages sur la ligne de droite) est répétée 30 fois pour une durée totale de tirs de 6 min.

IV-2.3.b) Résultats

La figure IV-7 montre les cartes de concentration en Gd obtenues après perméabilisation de la BHE et injection de Dotarem. On peut déjà observer qualitativement pour les deux animaux que la concentration semble plus élevée le long de la ligne exposée au duty cycle le plus important. Afin de quantifier cette augmentation, nous avons procédé de la façon suivante : pour chaque ligne de l'image, nous avons récupéré la valeur du voxel de concentration maximum pour chaque ligne de tir. Nous avons calculé ensuite pour chaque ligne de tir une moyenne de ces maxima. Pour les deux rats, la concentration de Dotarem délivrée aux tissus cérébraux est $1,3 \pm 0,05$ fois plus importante pour la ligne ayant été exposée à des tirs continus, la pression acoustique et le temps total d'exposition aux

ultrasons étant égaux par ailleurs en chaque point et les deux lignes étant situées dans les mêmes régions anatomiques. On peut en outre noter qualitativement que la concentration semble plus homogène le long de la ligne de duty cycle le plus important. Notons enfin qu'aucun signe de dommage n'a été noté sur les images pondérées T_2 acquises à la fin du protocole, ni aucun signe clinique.

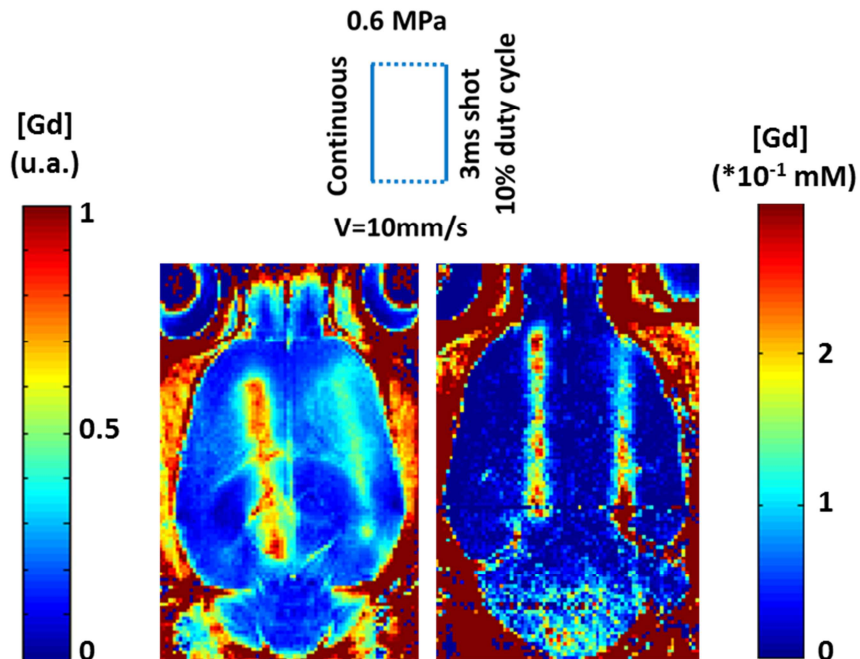


Figure IV-7 : Cartes de concentration en Gd obtenues après perméabilisation de la BHE avec différents duty cycle. Un schéma représente la trajectoire utilisée. La ligne avec le duty cycle le plus faible a été balayée 10 fois de façon à ce que le temps total d'exposition aux ultrasons soit le même en chaque point.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces observations :

- La ligne de tirs continue induit un échauffement qui peut contribuer à amplifier l'ouverture de la barrière.
- Le stress des cellules endothéliales augmente avec le temps passé en interaction membranaire avec les bulles. En effet, en considérant que le seuil de perméabilisation est d'environ 0,3 MPa (d'après de précédentes études), et étant donné la largeur à mi-hauteur de la tache focale (chapitre II), avec une pression au point focal de 0,6 MPa le seuil est dépassé sur une largeur d'environ 1 mm. Considérons maintenant un point situé sur une ligne de tir. Pour un passage du transducteur, avec une vitesse de 10mm.s^{-1} , dans le cas de tirs continus ce point va connaître une pression supérieure au seuil de perméabilisation durant environ 100 ms. Dans le cas du duty cycle de 10 %, pour un passage ce point connaîtra cette pression durant seulement environ 10 ms (3 x 3 ms environ). Les durées totales d'exposition étant égales par ailleurs, ceci confirmerait qu'une durée de pulse plus longue entraîne une perméabilisation plus efficace (Choi, Selert, Gao, et al. 2011).

Nous allons étudier l'hypothèse 1 au paragraphe suivant.

Ces résultats dépendants du duty cycle suggèrent en tout cas que l'index mécanique (MI), communément utilisé pour caractériser et prévoir l'efficacité de la perméabilisation ainsi que ses effets (McDannold et al. 2008a) ne suffit pas à décrire complètement le phénomène : la dynamique des tirs compte aussi beaucoup. Il est défini de la façon suivante :

$$MI = \frac{P_{ac}}{\sqrt{F}} \quad (IV.1)$$

Avec P_{ac} la pression acoustique, et F la fréquence des ultrasons (1,5 MHz dans ce cas). On voit d'après cette équation que cet index ne comporte aucun terme tenant compte de la durée des tirs ou du duty cycle. Nous suggérons néanmoins d'étendre ces expériences sur un nombre d'animaux plus important, ainsi que de tester d'autres valeurs de duty cycle afin de compléter ces résultats préliminaires. Faire varier la vitesse de balayage à duty cycle identique serait aussi très intéressant pour valider l'hypothèse 2 ci-dessus.

IV-3.3. Vérification de l'élévation de température induite lors d'une perméabilisation selon une trajectoire arbitraire

Nous avons montré dans le paragraphe précédent que des tirs continus durant le mouvement du transducteur permettaient d'obtenir une perméabilisation plus efficace. Or il a été rappelé en chapitre introductif que l'application d'ultrasons sur des tissus, en particulier lorsqu'ils sont tirés de façon continue, pouvait engendrer une élévation de température. Bien que cet effet puisse être utilisé de façon à détruire des tissus pathologiques, il est évidemment à proscrire lorsque l'on souhaite réaliser une perméabilisation de la BHE qui soit réversible et transitoire. Ici, nous travaillons à basse pression, en déplaçant le transducteur et sur des durées limitées (par exemple la trajectoire de gauche correspond à 1s de tirs continus en déplacement toutes les 12 s répété 30 fois au total). Bien que peu probable, nous allons vérifier si un échauffement notable (ie $> 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, la précision de mesure de notre séquence de thermométrie) a été induit lors des tirs continus, grâce à la thermométrie par IRM.

L'élévation de température a pu être mesurée pendant l'exécution de la trajectoire précédente pour le 2eme rat traité uniquement.

Afin de réaliser la thermométrie par IRM, nous avons utilisé la séquence FLASH I-1. La coupe horizontale a été placée sur la coupe correspondant au maximum du signal mesuré en ARFI, c'est-à-dire la coupe contenant le point focal.

Dans un premier temps, la séquence est démarrée avant le début de l'envoi des ultrasons afin d'enregistrer des images de référence. 2 minutes après le début de la séquence IRM, les ultrasons sont tirés durant 6 minutes pour perméabiliser la BHE, puis le signal IRM est encore enregistré durant environ 3 min pour observer la relaxation thermique.

IV-3.4. Résultats

Dans le cas de notre expérience, du fait du mouvement du transducteur qui modifie localement les inhomogénéités de champ magnétique en fonction de sa position, les images de phase enregistrées durant les tirs ultrasonores se sont révélées inexploitables car trop fluctuantes (il aurait fallu synchroniser l'acquisition de thermométrie avec les déplacements moteurs pour y arriver) et l'on ne peut donc pas mesurer directement si les ultrasons ont provoqué un échauffement. Afin de

contourner ce problème, nous avons regardé l'évolution de la phase de l'image à la fin de l'application des ultrasons. En effet, si un échauffement s'est produit, il faut un certain temps pour que la chaleur se dissipe dans les tissus. Ainsi, si un échauffement a eu lieu on devrait observer un changement de la phase correspondant à une diminution de température entre le temps $t = 0+$ immédiatement après l'arrêt des ultrasons et le temps $t = 3\text{min}$ après l'arrêt des ultrasons. Nous avons donc utilisé comme images de référence les dernières répétitions de la séquence, qui ont été soustraites aux images acquises immédiatement après l'arrêt des ultrasons. Préalablement à tout calcul, les images de phase ont été déroulées grâce à un algorithme dédié sous Matlab (Maier et al. 2015). Les images de variation de température sont alors calculées selon l'équation (I.4), en soustrayant à chaque image la dernière image acquise. L'évolution temporelle de la moyenne de la variation de température dans une ROI de 2×20 pixels située sur la ligne pour laquelle les ultrasons sont tirés de façon continue est présentée sur la figure IV-8. Cette figure présente également la même évolution sur un voxel unique appartenant à cette ligne.

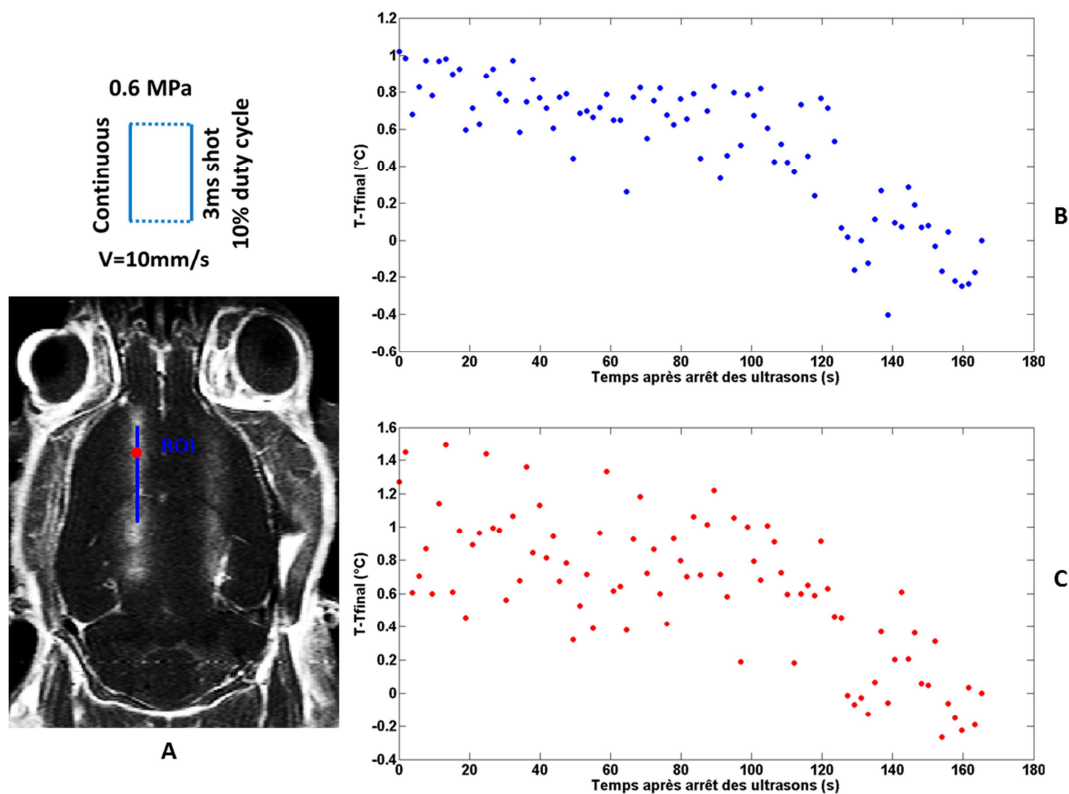


Figure IV-8 : Evolution de la température après arrêt des ultrasons. A. Image pondérée T_1 acquise à l'issue du protocole confirmant la perméabilisation de la BHE (hypercontraste du à l'infiltration de Gd), et emplacement des ROI utilisées pour le calcul de la température. La courbe B représente la différence de température (en °C) entre chaque dynamique acquise après arrêt des ultrasons et la dernière des dynamiques acquises, moyennée sur la ROI représentée en A (ligne bleue). C. Même courbe que B pour un voxel de cette ligne, représenté par un point rouge sur A.

On peut noter sur ces courbes que la température semble diminuer après l'arrêt des ultrasons. Néanmoins, cette variation est située entre 1 et 1,5 °C sur les deux courbes. Cette valeur est à comparer avec la sensibilité de la mesure de température. Elle est habituellement définie comme l'écart type σ_T sur les images de carte de température dans une zone ne subissant pas de variation de température (Rieke & Pauly 2009). Dans le cas de l'expérience présentée, nous avons

calculé une précision de la mesure de température de $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, soit l'ordre de grandeur des variations observées. On peut donc conclure dans ce cas que la variation de température engendrée par des tirs continus lors d'un déplacement du transducteur pour la pression acoustique utilisée est au maximum de l'ordre de la précision de mesure, c'est-à-dire inférieure à $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ces premières expériences nous ont ainsi permis de définir un protocole plus efficace et a priori plus sûr pour la réalisation de perméabilisations étendues de la BHE. Les paramètres retenus sont donc : tirs continus, pression acoustique au point focal de $0,6\text{ MPa}$ et vitesse de déplacement de 10 mm.s^{-1} .

IV-4. Perméabilisation étendue de la BHE

Ces premiers tests ont permis de prouver la faisabilité d'une perméabilisation de la BHE selon des trajectoires arbitraires, et de déterminer des paramètres acoustiques permettant de l'induire de façon efficace et sûre. Cette propriété peut être intéressante lorsque l'on cherche à délivrer des molécules à des régions étendues du cerveau, par exemple pour des pathologies affectant l'intégralité du SNC comme la maladie d'Alzheimer. Ainsi, lors d'une deuxième série d'expériences nous avons cherché à montrer la faisabilité d'une perméabilisation globale de la BHE c'est à dire couvrant tout un hémisphère voire tout le cerveau.

Pour réaliser ce deuxième protocole, deux rats ont été utilisés. Une première trajectoire testée sur un rat de 140 g (rat#3) pour induire une perméabilisation hémisphérique est présentée sur la figure IV-9.A. Les tirs ultrasonores sont continus, réalisés avec une pression acoustique estimée derrière le crâne de $0,8\text{ MPa}$. La trajectoire est répétée 60 fois, avec une pause de 100 ms entre chaque exécution, et une vitesse de déplacement des moteurs de 10 mm.s^{-1} .

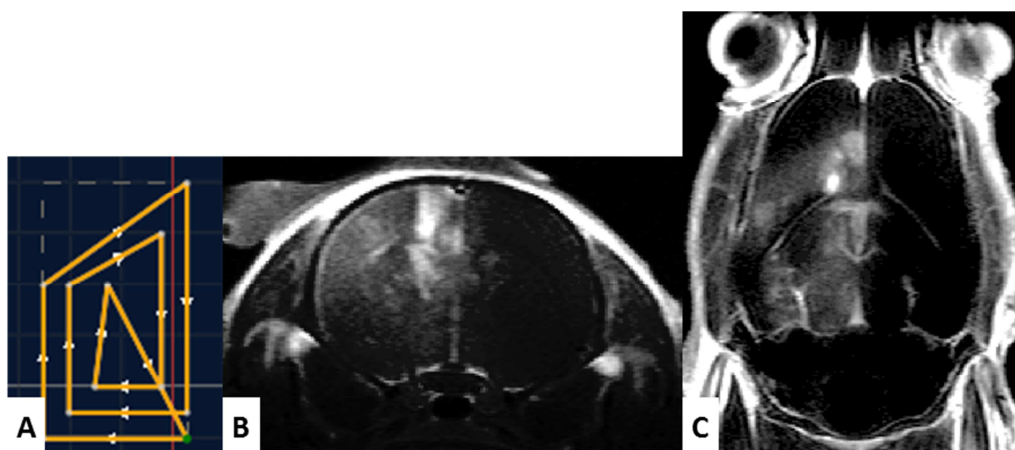


Figure IV-9 : Perméabilisation hémisphérique pour le rat #3. A. Trajectoire utilisée. B (resp. C) représente une image pondérée T_1 en orientation axiale (resp. horizontale) obtenue après injection de Gd.

Les images pondérées T_1 obtenues après injection de Gd (IV-9.B et C) confirment que la BHE a bien été perméabilisée uniquement sur l'hémisphère ciblé. On note cependant que la prise de contraste n'est pas parfaitement homogène. On retrouve en particulier la forme de la trajectoire sur la coupe horizontale (figure IV-9.C), ce qui pourrait être expliqué par l'espace trop important entre les segments de la trajectoire. Nous avons vu dans le chapitre II que la largeur à mi-hauteur de la tache focale était de $1,2\text{ mm}$ dans le plan parallèle au transducteur. Nous avons également rappelé

dans le chapitre introductif l'existence d'un seuil de pression acoustique à dépasser pour induire une perméabilisation de la BHE. Ainsi, lorsque l'espace entre deux segments est trop important les zones situées à l'aplomb de cet espace peuvent ne pas subir une pression suffisante pour observer une pénétration accrue de Gd.

D'autre part, on note un réhaussement du contraste plus important au niveau de la ligne interhémisphérique (IV-9.B). Cet effet pourrait être lié à des différences de facteur de transmission du crâne en fonction de la région considérée. En effet, la puissance électrique transmise au transducteur a été maintenue constante tout au long de l'expérience. Or si le facteur de transmission du crâne n'est pas homogène, la pression acoustique dans le cerveau ne sera pas la même selon la région considérée ce qui expliquerait des différences dans la quantité d'agent de contraste délivrée. Il est aussi possible que la perméabilisation de la barrière ventriculo cérébrale soit plus efficace que celle de la BHE donc que les Gd passent plus facilement des ventricules au cerveau que du sang au cerveau (d'où un réhaussement plus fort près des ventricules). On voit également un réhaussement plus fort dans les « coins » de la trajectoire. Notre hypothèse est que dans ces coins, l'interaction ultrasons/bulles est plus longue puisque du fait de la largeur de la tache focale, un point situé dans l'un de ces coins va connaître le champ acoustique des deux segments formant l'angle. Notons enfin que le rat est décédé le lendemain de l'expérience. Nous avons imputé ce décès à une pression acoustique trop élevée, ayant certainement créé des dommages dans les tissus cérébraux, bien qu'ils n'aient pas été constatés sur les images pondérées T_2 acquises à la fin du protocole.

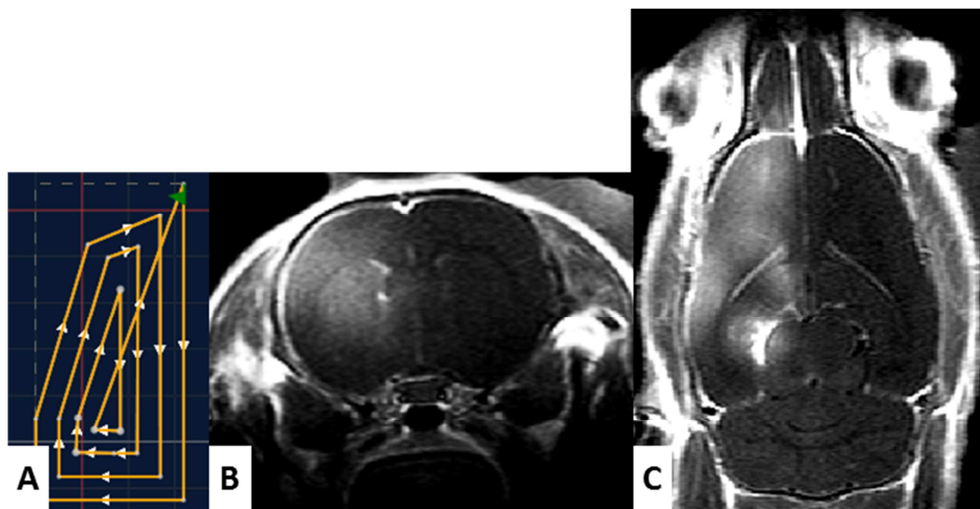


Figure IV-10 : Perméabilisation hémisphérique pour le rat #4. A. Trajectoire utilisée. B(resp. C) représente une image pondérée T_1 en orientation axiale (resp. horizontale) obtenue après injection de Gd.

Une deuxième trajectoire a été définie afin d'améliorer les résultats obtenus avec le rat #3, en utilisant un rat de 150 g (rat #4). Elle est présentée sur la figure IV-10.A. Les principaux changements apportés sont une réduction de la pression acoustique utilisée à 0,6 MPa, l'arrêt des tirs dans les « coins » de la trajectoire ainsi qu'un espacement réduit entre les différents segments de la trajectoire afin de couvrir l'hémisphère choisi de façon plus homogène. Elle est répétée 30 fois pour une durée totale de 6 minutes. La figure IV-10 montre les images pondérées T_1 en orientation axiale (B) et horizontale (C) obtenues après injection de Gd. On note grâce aux deux orientations que la prise de contraste est relativement homogène dans les trois directions. On note cependant au niveau du ventricule gauche une zone où le Gd semble avoir moins pénétré. Cet effet pourrait être

dû à la forme de la trajectoire utilisée, puisque les segments sont plus espacés au centre qui correspond à la position du ventricule. Une autre explication pourrait être la dépendance de la perméabilisation avec la région du cerveau considérée, puisque nous avons déjà constaté une prise de contraste moindre dans cette zone sur le rat #3. Avec cette pression acoustique, aucun dommage n'a été observé.

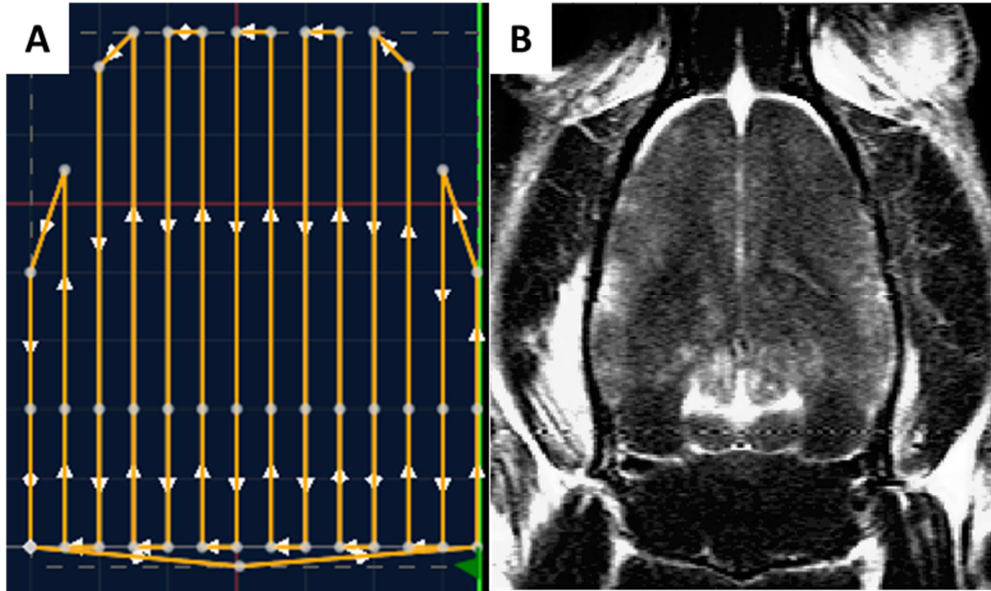


Figure IV-11 : Perméabilisation du cerveau entier pour le rat #5. A. Trajectoire utilisée. B représente une image pondérée T_1 en orientation horizontale obtenue une heure après injection de Gd.

Pour certaines applications, il peut être intéressant de délivrer des molécules à l'ensemble du cerveau. Ainsi, une preuve de concept d'une ouverture du cerveau entier a été réalisée sur un rat de 300 g (#rat5). Nous avons vu sur les expériences précédentes que la pénétration d'agents de contraste n'était pas parfaitement homogène dans les zones exposées aux ultrasons. Une des hypothèses que nous avons faites était une répartition de la pression non homogène au point focal en raison de la variation spatiale du facteur de transmission d'un crâne de rat. Aussi pour cette expérience, nous avons cherché à maintenir une pression *in situ* constante sur toute l'étendue de la trajectoire (figure IV-11.A). Pour ce faire, nous avons modulé la puissance électrique envoyée au transducteur en fonction de sa position en se basant sur la cartographie du facteur de transmission d'un crâne de rat présentée au chapitre II, pour maintenir une pression acoustique de 0,6 MPa au point focal. Une image pondérée T_1 en orientation horizontale obtenue après injection de Dotarem est présentée sur la figure IV-11.B. On observe effectivement un réhaussement du contraste dans l'intégralité du cerveau, contrairement au cervelet qui n'a pas été exposé aux ultrasons. D'autre part, la prise de contraste s'avère relativement homogène, on peut donc supposer que la modulation de la puissance électrique a permis d'obtenir une pression acoustique *in situ* plus constante que sans prise en compte du facteur de transmission. On notera également qu'aucun dommage n'a été observé sur les images pondérées T_2 .

IV-5. Perspectives

IV-5.1. Premières expériences de neuromodulation

La versatilité des ultrasons permet d'obtenir différents effets biologiques selon les paramètres expérimentaux. Ici, à partir du même dispositif, en changeant la fréquence de travail grâce au transducteur 650 kHz, nous avons pu réaliser les premières expériences de neuromodulation sous IRM utilisant ce système avec l'aide de Benjamin Fellah lors de son stage de master. Nous présentons ici brièvement cette technique, ainsi que les premiers résultats obtenus.

IV-1.5.a) La neuromodulation par ultrasons

Etre en mesure de moduler l'activité neuronale présente un grand intérêt à la fois dans une optique de recherche afin de mieux comprendre le fonctionnement du cerveau, mais également dans le traitement de certaines pathologies affectant le SNC.

Un certain nombre de techniques sont aujourd'hui utilisées en clinique. On peut notamment citer la stimulation cérébrale profonde (SCP) (Benabid et al. 1993), dont l'application principale est le traitement de certaines formes de la maladie de Parkinson, mais qui a également montré son potentiel pour d'autres pathologies telles que la dépression ou la dystonie. L'inconvénient principal de cette technique est qu'elle requiert une chirurgie cérébrale, et l'implantation permanente d'électrodes, des procédures invasives, lourdes et présentant un certain nombre de risques inhérents à ce type d'intervention. Une autre méthode de neurostimulation largement utilisée est la stimulation magnétique transcrânienne (SMT) (Barker et al. 1985). Ses applications principales sont le diagnostic de troubles neurologiques, le traitement de dépression chronique, et elle est très utilisée en tant qu'outil d'exploration des fonctions cérébrales dans la recherche en neurosciences. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive, mais elle est limitée par la faible résolution spatiale qu'elle offre (de 10 à 50 mm), et sa profondeur de pénétration ce qui empêche une discrimination précise des zones cérébrales ciblées.

L'effet modulateur des ultrasons sur la réponse des neurones du cortex visuel primaire avait déjà été démontré par Fry en 1958 (FRY et al. 1958). Plus récemment, des études ont prouvé qu'il était possible d'induire une réponse motrice grâce à une stimulation neuronale par ultrasons, sans induire de dommages au parenchyme cérébral (Tufail et al. 2010; Tyler et al. 2008). L'emploi des ultrasons pour stimuler les circuits neuronaux présente l'avantage d'être à la fois non-invasif, d'atteindre des structures profondes et d'offrir une résolution spatiale inférieure à 5 mm ce qui lui confère un important potentiel thérapeutique et diagnostique, mais également en tant qu'outil de recherche. De nombreux efforts ont ainsi été déployés au cours des dernières années afin de mieux caractériser les mécanismes impliqués et l'influence des paramètres ultrasonores (Younan et al. 2013; King et al. 2013). Ces progrès ont permis récemment d'appliquer cette technique avec succès lors d'essais cliniques (Legon et al. 2014).

Un autre avantage offert par la neuromodulation par ultrasons est qu'il est possible de réaliser la procédure sous IRM. On peut ainsi bénéficier des outils de guidage précédemment décrits, mais également profiter des informations offertes par l'IRM fonctionnelle. Ceci permet alors une visualisation des zones cérébrales activées par les ultrasons, et offre ainsi un formidable outil pour comprendre plus précisément le fonctionnement du SNC (Yoo et al. 2011). Cette partie présente la

mise au point d'un protocole de neuromodulation par ultrasons sous IRM utilisant le système motorisé que nous avons développé.

IV-1.5.b) Protocole de neuromodulation sous IRM

Le protocole présenté a d'abord été optimisé hors IRM par Benjamin Fellah lors de son stage de master afin de garantir son efficacité. Le succès de l'expérience a été prouvé par des signes moteurs, la neuromodulation étant considérée comme effective lorsqu'un mouvement de la queue ou des pattes de l'animal était corrélé avec les tirs ultrasonores.

Un soin particulier a été apporté à l'élaboration d'un protocole d'anesthésie satisfaisant. En effet, ces expériences sont particulièrement sensibles à l'anesthésie choisie, puisqu'une sédation trop profonde de l'animal le rend insensible à la stimulation motrice. Il doit néanmoins être suffisamment anesthésié pour des raisons éthiques évidentes. Il est donc généralement nécessaire d'attendre un certain temps après l'induction de l'anesthésie avant de procéder au protocole de neuromodulation, et la fenêtre temporelle durant laquelle l'animal est stimuable est relativement limitée. Un travail a donc été effectué afin de déterminer le temps à partir duquel l'animal était stimuable, et également afin de rallonger la période durant laquelle le rat répondait aux stimulations afin que cette durée soit compatible avec l'installation et les durées d'acquisition d'images en IRM (environ 30 min). La séquence d'ultrasons a également été optimisée hors IRM, à partir des travaux de Tufail (Tufail et al. 2010).

Un rat (330 g) a été utilisé. Son crâne est préalablement rasé afin d'assurer un bon couplage avec les ultrasons. L'animal est anesthésié avec un mélange de kétamine et de xylazine par un bolus en intramusculaire (IM) (40 mg.kg^{-1} , 5 mg.kg^{-1}), puis il est installé dans le lit du système motorisé. Une sonde de température rectale et un capteur de sa fréquence respiratoire sont mis en place pour suivre ses fonctions vitales au cours de l'expérience. Un cathéter est également installé en intra péritonéal afin de pouvoir effectuer une infusion d'anesthésique au cours de l'expérience. Le transducteur est alors couplé au crâne avec du gel échographique, et placé visuellement vers l'arrière du crâne de l'animal qui est la zone identifiée hors-IRM pour induire une neuromodulation induisant des contractions musculaires périphériques.

La première étape consiste à placer hors IRM le transducteur de façon à obtenir une stimulation neuronale. Environ 40 minutes après l'induction de l'anesthésie, la séquence suivante est envoyée au transducteur : 0,4 ms de tir, suivies de 0,4 ms de pause, l'ensemble étant répété 1000 fois pour une durée totale de 800 ms. La pression au point focal a été estimée à 1,5 MPa à partir des courbes de calibration de la sonde et des mesures du facteur de transmission de crâne de rat en cuve. Le transducteur est alors déplacé, et la séquence ultrasonore répétée jusqu'à observer un mouvement de la queue ou des pattes de l'animal corrélé avec l'envoi des ultrasons, signe d'une neuromodulation efficace. Le transducteur est alors fixé à cette position. Lorsque le phénomène de neurostimulation est constaté, une infusion de kétamine est également mise en place en voie intra péritonéale par le cathéter préalablement installé ($50 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) afin de maintenir une anesthésie suffisante mais permettant la stimulation neuronale, puis l'animal est introduit dans le scanner IRM.

La première partie de l'expérience consiste à utiliser l'imagerie fonctionnelle conjointement à la neuromodulation par ultrasons afin d'observer une éventuelle réponse neuronale. Pour ce faire, une séquence d'imagerie BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) a été utilisée. La méthode

d'acquisition est une Spin Echo Echo Planar Imaging (SE-EPI) présentant les paramètres suivants : $TE/TR = 35/1000$ ms, matrice = $100 \times 100 \times 4$, résolution = $0,320 \times 0,320 \times 1,50$ mm³, $b = 10$ s.mm⁻². Les séquences de type EPI étant très sensibles aux artefacts, il est impossible d'acquérir ces images durant les tirs ultrasonores. Nous avons donc adopté le schéma d'acquisition suivant :

- La stimulation ultrasonore est d'abord effectuée durant 800 ms selon la séquence précédemment décrite. Une pause de 200 ms est alors marquée afin de laisser les tissus relaxer pour éviter tout mouvement résiduel dû à la force de radiation acoustique.
- L'acquisition BOLD s'effectue à l'issue de la période de tirs ultrasonores et de la pause de 200 ms, soit 1 s après le début des tirs, en estimant que la réponse hémodynamique persiste après la stimulation. La durée totale d'acquisition est de 1 s.

Les variations de signal en BOLD étant relativement faibles, cette séquence est répétée 20 fois, soit une durée totale de 40 s. Dans un premier temps, la séquence est acquise sans tirs ultrasonores afin de servir de référence. Les 40 secondes suivantes sont dédiées à l'acquisition avec de la neurostimulation. L'ensemble est répété 3 fois, pour une durée totale de 240 s. Le schéma d'acquisition est rappelé sur la figure IV-12. Durant les tirs ultrasonores, l'efficacité de la neuromodulation est contrôlée visuellement par les mouvements de la queue de l'animal en laissant la porte arrière du scanner ouverte.

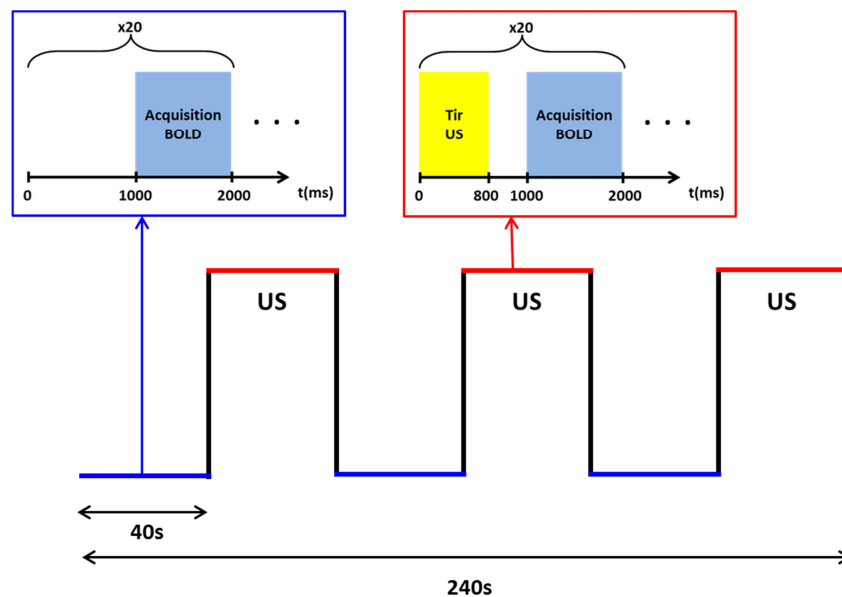


Figure IV-12 : Schéma de l'acquisition des images BOLD. En rouge, les périodes durant lesquelles les ultrasons sont tirés pour induire la neuromodulation. En bleu, séquences d'acquisition des images de référence.

Des images anatomiques pondérées T_2 en orientation axiale sont ensuite acquises. Elles serviront à la fois d'images de référence pour le signal, et ont également été utilisées pour estimer grossièrement la position de la tache focale. En effet, des expériences précédentes nous ont montré que l'utilisation de ce transducteur ne permettait pas l'utilisation de l'imagerie ARFI. La fréquence basse induit une moindre absorption de l'énergie par les tissus, donc une force de radiation trop faible pour induire un mouvement détectable. D'autre part, la pression maximum délivrée par l'ensemble transducteur/amplificateur utilisé dans cette étude n'est probablement pas suffisante.

Le traitement des images BOLD a été réalisé sous SPM8 par Tomokazu Tsurugizawa. Les images ont été réalignées sur les images T_2 axiales, lissées, et une correction temporelle a été appliquée aux coupes d'imagerie (« slice timing »).

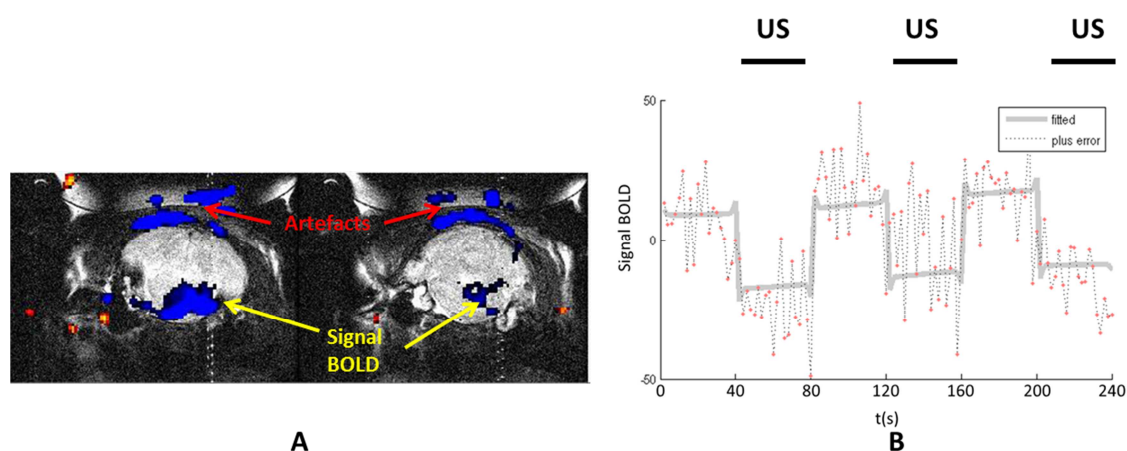


Figure IV-13 : Résultats de l'acquisition BOLD. A. Zones activées (en bleu) recalées sur une image pondérée T_2 en orientation axiale. Les flèches rouges indiquent des artefacts, les flèches jaunes le signal utile. B. Evolution du signal BOLD d'un voxel d'une zone activée au cours du temps. On observe une baisse du signal corrélée avec les tirs ultrasonores.

La figure IV-13.A montre les deux coupes en orientation axiale sur lesquelles nous avons noté une variation du signal BOLD corrélée avec l'envoi des ultrasons. Elles sont situées au niveau du cervelet. L'activation est matérialisée par une couleur bleue, qui correspond à une diminution du signal. On peut distinguer deux régions dans lesquelles le signal a varié. La zone située sur la partie supérieure de l'image est probablement un artefact dû au mouvement d'eau dans le ballon suite à l'application des ultrasons. La zone présentant un signal BOLD dans la partie inférieure de l'image pourrait correspondre à une réponse neuronale. La figure IV-13.B présente l'évolution temporelle du signal BOLD d'un voxel appartenant à cette région qui semble activée. On observe effectivement une baisse du signal durant l'application des ultrasons, mais cette variation n'est pas significative, en particulier pour les deuxième et troisième séquences d'ultrasons. Il est donc difficile d'affirmer sur la seule base de ce résultat qu'une réponse neuronale a été obtenue. L'antenne intégrée au système ultrasonore étant encore largement améliorable, la qualité des images BOLD et T_2 doit encore être améliorée pour permettre de travailler plus proprement sur ce protocole.

Cette première preuve de concept montre donc la faisabilité d'une neurostimulation par ultrasons sous IRM en utilisant le système motorisé préalablement décrit. Des premiers résultats encourageants semblent montrer une réponse neuronale sur l'imagerie BOLD, ce qui confirme l'intérêt de ce dispositif puisqu'il pourrait permettre une exploration plus fine du fonctionnement cérébral en couplant l'imagerie fonctionnelle par IRM au potentiel neuromodulateur des ultrasons. Les variations de signal observées étant néanmoins très faibles, il sera nécessaire de répéter cette expérience sur un plus grand nombre d'animaux afin de confirmer ces premiers résultats.

IV-6. Conclusion

La validation des capacités de ce système a été réalisée par le biais de deux séries d'expériences. Dans un premier temps, nous avons montré que ce dispositif permettait de cibler de façon reproductible des zones du cerveau à perméabiliser grâce à l'utilisation conjointe de l'imagerie ARFI et de la motorisation du transducteur. Dans un deuxième temps, nous avons démontré que ce système permettait de perméabiliser la BHE selon des trajectoires arbitrairement définies.

Nous avons ensuite montré que lors d'une perméabilisation étendue de la BHE associée à un déplacement du transducteur, l'augmentation de la pression acoustique ainsi que du duty cycle entraînait une augmentation de la dose délivrée. Nous avons également montré qu'une telle procédure n'entraînait pas d'échauffement des tissus cérébraux.

Ces résultats ont été utilisés pour réaliser des perméabilisations hémisphériques et sur le cerveau entier, ce qui ouvre des perspectives dans le diagnostic et le traitement de pathologies touchant l'ensemble du SNC.

Enfin, nous avons réalisé une première preuve de concept de neuromodulation sous IRM en utilisant ce dispositif. Nous avons ainsi montré la modularité offerte par ce système.

V. Etude des effets de la perméabilisation de la BHE par ultrasons et amélioration de sa sécurité

Nous avons rappelé dans le chapitre introductif les principaux effets, mécaniques et thermiques, résultant de l'interaction entre les ultrasons et les tissus. Ils peuvent être suffisamment importants pour générer des lésions, ce qui peut être utilisé à des fins thérapeutiques pour détruire des tissus pathologiques. Ils doivent en revanche être contrôlés lorsque l'intégrité des zones traitées doit être sauvegardée, comme c'est le cas lors de la perméabilisation de la BHE.

De nombreuses études ont ainsi cherché à déterminer l'influence des différents paramètres acoustiques à la fois sur l'efficacité de la perméabilisation de la BHE, mais également sur les réactions tissulaires engendrées, afin de garantir l'innocuité du protocole. Néanmoins, l'ensemble de ces études a été mené sur des protocoles de perméabilisation ponctuelle, c'est à sans dire sans déplacement du transducteur. D'autre part, certaines réactions au niveau cellulaire sont encore relativement mal comprises.

L'objectif de ce chapitre est de présenter différentes études que nous avons réalisées en vue d'étudier plus précisément les effets d'une perméabilisation de la BHE, en particulier sur des zones étendues, ainsi que d'introduire des solutions mises en œuvre pour améliorer la sûreté et l'efficacité de notre protocole. Dans un premier temps, une étude histologique de certains effets à court et moyen terme suivant la perméabilisation de la BHE sera décrite. Nous décrirons ensuite les premiers résultats d'une étude visant à identifier le passage de protéines non plus du sang vers le cerveau, mais des tissus cérébraux vers la circulation sanguine. Enfin des études prospectives seront abordées en perspectives de ce chapitre.

V-1. Etude histologique des effets à court et moyen terme d'une perméabilisation transitoire de la BHE par ultrasons

V-1.1. Etat de l'art et motivations

Nous avons vu que l'utilisation des ultrasons offraient des perspectives très encourageantes pour la délivrance de médicaments au cerveau, puisque la perméabilisation de BHE obtenue présente l'avantage d'être ciblée et transitoire. Néanmoins, les ultrasons peuvent engendrer des effets indésirables suite à leur interaction avec les tissus, aussi les principales équipes travaillant sur cette technologie ont-elles cherché à explorer plus finement les réactions biologiques induites par cette technique au niveau cellulaire. Pour ce faire, l'histologie représente un outil de choix.

La plupart des études avant 2010 se sont contentées d'une coloration standard hématoxyline/éosine sur quelques coupes correspondant à la zone insonifiée. L'effet principal rapporté dans la littérature est la présence de pétéchies hémorragiques au sein des tissus cérébraux suite à l'application des ultrasons (Liu et al. 2008; McDannold et al. 2005), généralement mises en évidence par une coloration hématoxyline/éosine (H&E) comme l'illustre la figure V-1. L'hypothèse a été émise que cette extravasation de globules rouges était majoritairement due à la cavitation inertielle, puisqu'une étude a montré l'absence de pétéchies en l'absence de cavitation inertielle (McDannold et al. 2006). Au contraire, augmenter la pression acoustique ou la durée totale

d'exposition entraîne des hémorragies plus importantes, voire des lésions tissulaires (Chopra et al. 2010; Liu et al. 2008) comme l'illustre la figure V-1 (B et C).

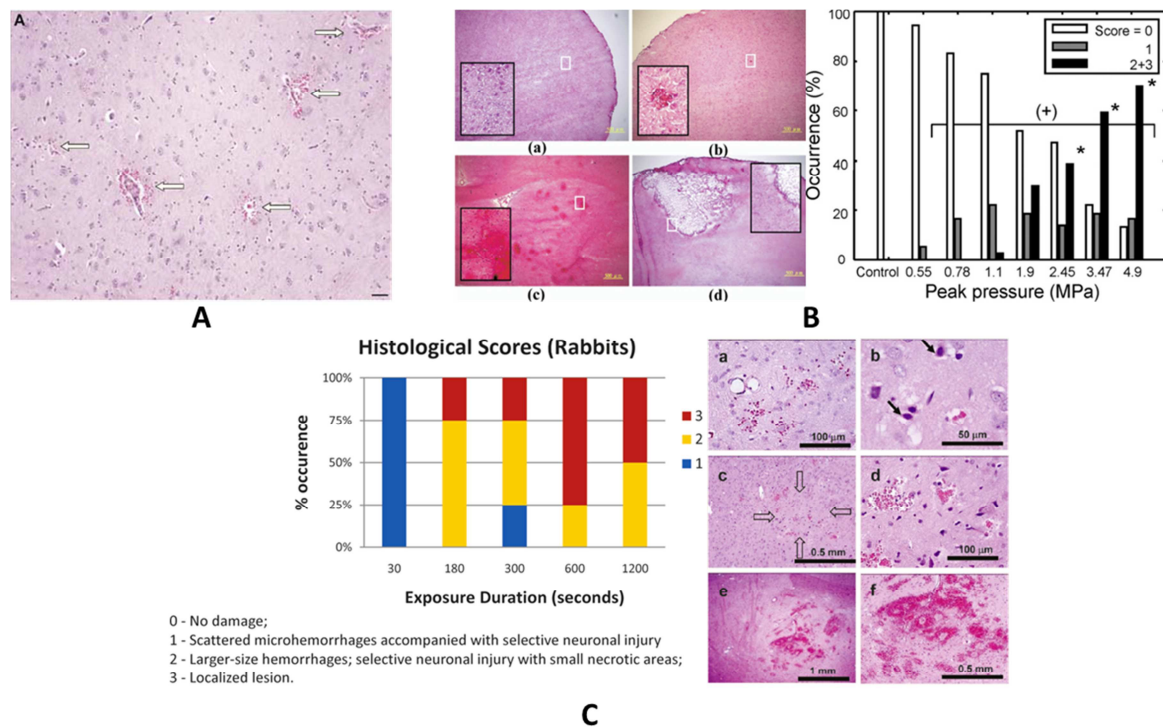


Figure V-1 : Effets observés par un marquage H&E. A. Pétéchies hémorragiques désignées par les flèches blanches (McDannold et al. 2005). B. Différents grades de dommages observés en fonction de la pression acoustique. (a) grade 0 : aucun dommage observé. (b) grade 1: quelques petites extravasations de globules rouges dans la zone de la tache focale. (c) grade 2 : extravasations importantes et hémorragie dans la zone insonifiée et en dehors. (d) extravasations importantes et nécrose des tissus (Liu et al. 2008). C. Différents grades de dommages observés en fonction de la durée totale de tir. (a) gade 1. (b) grade 2. (c,d) grade 2, (d) zoom sur la zone nécrotique désignée par les flèches sur (c). (e,f) grade 3, présence d'hémorragies importantes(Chopra et al. 2010).

Certaines de ces études ont également recherché conjointement des signes d'apoptose ou d'ischémie qui pourraient survenir en cas de dommages vasculaires trop importants, notamment grâce au marquage TUNEL. Ces études reportent la présence ponctuelle de quelques corps apoptotiques comme le montre la figure V-2, notamment de cellules gliales. La présence systématique de mort cellulaire intervient uniquement pour des pressions très élevées, hors de la gamme généralement utilisée pour induire une perméabilisation de la BHE (Hynynen et al. 2005).

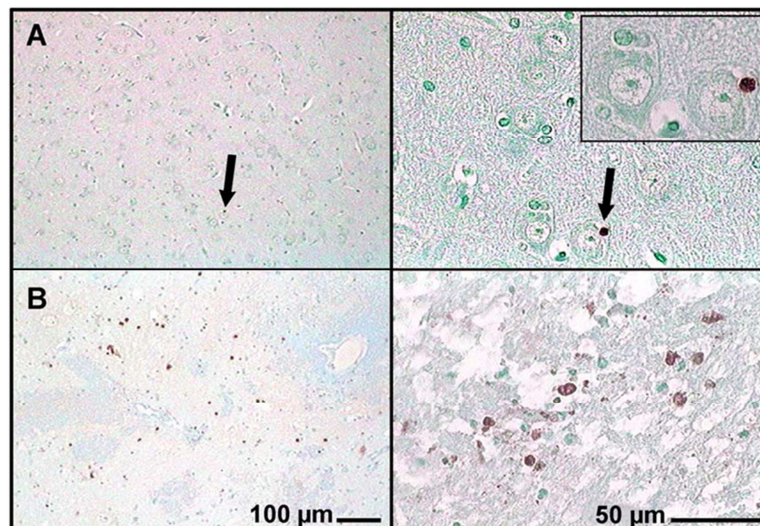


Figure V-2 : Marquage TUNEL et exemples de cellules apoptotiques (couleur marron). A. Pression de 1,4MPa, une seule cellule apoptotique est retrouvée (flèche noire). B. Pression acoustique de 3,1 MPa, présence de plusieurs cellules apoptotiques (Hynynen et al. 2005).

Plus récemment, des travaux utilisant des immunomarquages ont été présentés (résumés dans le tableau V-1). En particulier, une étude s'est intéressée au stress cellulaire induit par la procédure de perméabilisation de la BHE par ultrasons en étudiant certains marqueurs de ce stress (Alonso et al., 2010). Les auteurs ont montré que l'application des ultrasons entraînait une surexpression de l'ubiquitine par les neurones, une protéine impliquée dans la chaîne de dégradation des protéines défailtantes. Les auteurs suggèrent deux hypothèses :

- Les ultrasons pourraient induire des dommages aux neurones résultant en un dysfonctionnement de la transcription de cette protéine, comme il a été constaté à la suite d'ischémies.
- La surexpression de cette protéine interviendrait seulement comme une réponse neuroprotectrice suite au stress cellulaire déclenché par les ultrasons.

| Etude | Paramètres acoustiques | Effets reportés |
|------------------------|--|---|
| (Alonso et al., 2010) | 1 MHz Tirs 10ms PRF 1 Hz Temps total 1 min P = 1,27 MPa Optison | Stress neuronal (surexpression ubiquitine) Sacrifice à 0h |
| (Alonso et al., 2010B) | 1 MHz Tirs 10 ms PRF 1 Hz Temps total 1 min P = 1,25 MPa Optison | Réorganisation des plaques jonctionnelles des neurones et des astrocytes (entre 0 et 3 h) Effet réversible 24 h après insonification |
| (Alonso et al., 2011) | 1 MHz Tirs 10 ms PRF 1 Hz Temps total 1 min P = 1,25 MPa Optison | Activation des cellules gliales Phagocytose de l'albumine par les cellules gliales Sacrifice entre 0 et 24h |
| (Jordao et al., 2013) | 0,5 MHz Tirs 10 ms PRF 1 Hz Durée totale 2 min P = 0,3 MPa Definity | Activation des cellules gliales augmentant avec le temps (jusqu'à 15 jours) |

Tableau V-1 : Principaux effets potentiellement délétères reportés par des études immunohistochimiques.

Enfin, il a été montré récemment que l'application des ultrasons entraînait une activation des cellules gliales (astrocytes et microglie) augmentant avec le temps jusqu'à 15 jours après insonification (Jordão et al. 2013). Ces cellules sont impliquées dans la réponse inflammatoire du cerveau, ce qui suggère l'induction d'un stress des cellules cérébrales suite à la perméabilisation, voire de dommages (réversibles ou non). Ces résultats sont illustrés sur la figure V-4.

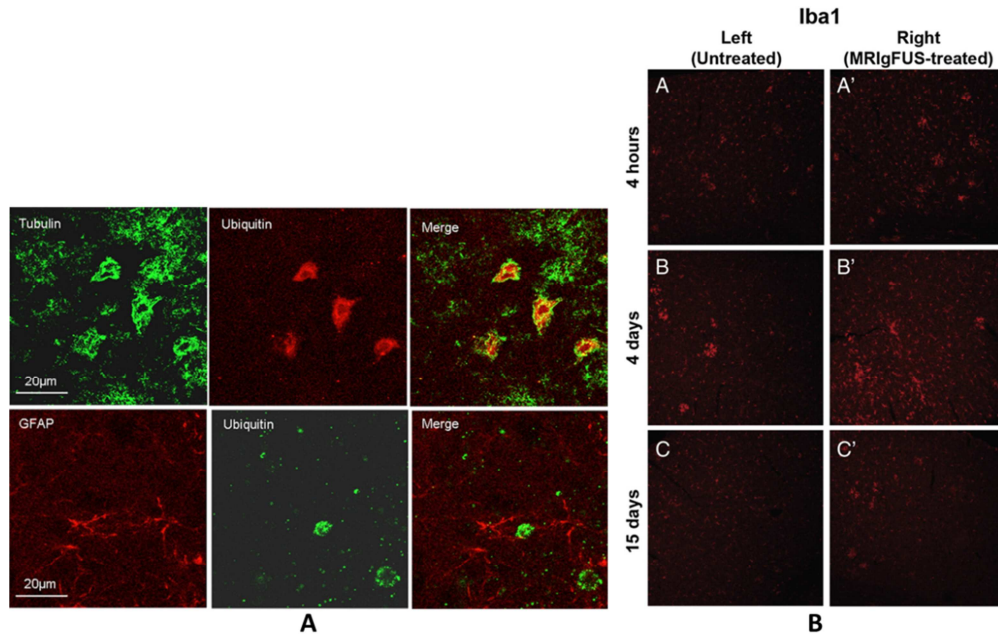


Figure V-3 : A. Ubiquitination sélective des neurones. Première ligne : double marquage de la tubuline (vert), spécifique des neurones, et de l'ubiquitine (rouge) (Alonso et al. 2010). B. Augmentation de l'activation de la microglie, marquée par Iba1 (rouge), au cours du temps dans la zone traitée par ultrasons (colonne de gauche) (Jordão et al. 2013).

Les conclusions de ces travaux permettent de penser que la procédure induit des dommages au niveau cellulaire (pétéchies hémorragiques, apoptose ponctuelle), mais que ces dommages sont limités par rapport aux bénéfices attendus. Par ailleurs, des travaux réalisés sur des primates ont montré que la perméabilisation n'induisait pas de changement comportemental chez les animaux (McDannold et al. 2012). Néanmoins, la majorité de ces études a étudié uniquement les effets à court terme des ultrasons, c'est-à-dire de 0 à 24h après la perméabilisation de la BHE. Deux études seulement ont étudié les effets à long terme, l'une montrant l'absence de dommages neuronaux 4 semaines après l'application des ultrasons chez le lapin (McDannold et al. 2005), tandis que la deuxième a montré une augmentation croissante de l'activation des cellules gliales jusqu'à 15 jours après la perméabilisation chez des souris (Jordão et al. 2013). Dans le but de transposer cette technique vers des applications cliniques, il est cependant essentiel de bien caractériser les différents effets indésirables potentiellement induits, aussi bien à court terme qu'à long terme. Ceci est d'autant plus vrai qu'une des applications aujourd'hui la plus prometteuse est le traitement de la maladie d'Alzheimer par une perméabilisation répétée (Leinenga & Götz, 2015), ce qui implique un traitement ultrasonore chronique sur une durée relativement longue.

Dans cette étude, nous avons donc cherché à compléter les données existantes dans la littérature en étudiant les effets à court et moyen terme de la perméabilisation de la BHE pour différentes valeurs de pression acoustique, en étudiant en particulier les marqueurs de la

neuroinflammation. Afin de compléter les données de la littérature, principalement obtenues par des colorations, nous avons choisi d'effectuer des marquages immunohistochimiques.

V-1.2. Matériel et méthodes

V-2.1.a) Protocoles de perméabilisation de la BHE

Pour cette étude, nous avons utilisé des rats ($n = 17$, 130-200 g). L'ensemble de l'expérience est réalisé hors IRM, et la perméabilisation de la BHE est réalisée selon le protocole décrit au paragraphe IV-1.1.

Pour générer les ultrasons, nous avons utilisé le transducteur monoélément 1,5 MHz et le système de génération de signaux présentés au paragraphe II-6.1.

Afin de tester l'influence de la pression acoustique, les rats ont été divisés en trois groupes. Pour chaque groupe, la perméabilisation a été réalisée avec une pression différente. Un premier groupe ($n = 6$) a subi une pression de 0,4 MPa, que nous avons estimé dans une précédente étude comme induisant une perméabilisation sans dommage apparent. Un deuxième groupe ($n = 6$) a été exposé à une pression de 0,7 MPa identifiée comme potentiellement dangereuse, avec l'observation dans certains cas d'oedèmes en imagerie ou d'hémorragies. Un dernier groupe ($n = 5$) a subi une pression de 1,4 MPa, non testée préalablement mais identifiée comme suffisamment élevée pour créer des dommages importants. Les pressions indiquées ont été calculées à partir des courbes de calibration du transducteur, et en prenant un facteur de transmission du crâne égal à 0,7 pour des animaux de ce poids (cf chapitre II).

V-2.1.b) Immunohistochimie

L'ensemble du protocole de prélèvement des cerveaux (extraction et préparation) et d'histologie (marquage, coupes, microscopie) a été réalisé par Françoise Geffroy.

Les rats ont été exsanguino-perfusé et sacrifiés à différents temps après l'application des ultrasons (de 1 h à 14 jours), puis leur cerveau a été extrait. Le protocole détaillé est disponible en annexe 1.

Après leur extraction, une observation macroscopique des cerveaux a été réalisée afin d'identifier une éventuelle hémorragie en surface ou un changement de l'aspect des tissus. Ils ont ensuite été découpés au cryostat (20 μm d'épaisseur) puis différents marquages immunohistochimiques ont été réalisés. Le protocole détaillé de ces immunomarquages est fourni en annexe B. A noter que toutes les coupes n'ont pas pu être imagées au microscope et que nos efforts se sont concentrés sur les zones où un changement avait été observé macroscopiquement le cas échéant, ou bien dans la zone estimée de focalisation des ultrasons. Une coloration au DAPI a été effectuée. Cette molécule fluorescente possède une forte affinité pour les bases nucléiques adénine et thymine et se lie donc fortement aux brins d'ADN. Le DAPI est ainsi couramment utilisé pour visualiser les noyaux des cellules. Il permet à la fois de guider l'exploration histologique, mais peut également renseigner sur la densité cellulaire d'une région du cerveau.

Un anticorps anti-caspase3 et procaspase activée (Abcam, Royaume-Uni, référence(ref) : ab13847) a été utilisé pour révéler les cellules apoptotiques dans les zones exposées aux ultrasons (Nicholson et al. 1995).

Afin de rechercher des signes de neuroinflammation, nous avons également procédé à un marquage de la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, Abcam, réf : ab7260). Cette protéine est surexprimée par les astrocytes lorsqu'ils sont activés, un phénomène survenant en réponse à une agression du SNC (Sofroniew & Vinters 2010).

Afin de compléter ces informations, d'autres informations ont été recherchées sur un nombre restreint d'animaux à titre préliminaire. Le marquage Iba1 (Abcam, réf : ab5076), une protéine spécifique de la microglie et des macrophages, a été testé dans le but d'étudier l'activation microgliale, un autre signe de neuroinflammation. Enfin, un marquage NeuN (Millipore, Etats-Unis, réf : Mab377X) ciblant spécifiquement les neurones a été testé pour compléter les informations apportées par le marquage DAPI et détecter une éventuelle raréfaction des neurones.

V-1.3. Résultats

| Pression acoustique | Signes cliniques | Hémorragies | Autres observations |
|---------------------|------------------|-----------------------------|--|
| 0.4 MPa | none | 1/6 (small) | 1/6 cerveau friable 3/6 point rosé 2/6 tache décolorée |
| 0.7 MPa | none | 4/6 (3 small, 1 massive) | 0/6 cerveau friable 1/6 point rosé 2/6 tache décolorée |
| 1.4 MPa | none | 1/5 (small) | 0/5 cerveau friable 0/5 point rosé 2/5 tache décolorée |

Tableau V-2 : Observations macroscopiques des différents cerveaux.

Le tableau V-2 résume les observations macroscopiques réalisées sur l'ensemble des rats. Nous pouvons déjà noter qu'aucun signe clinique particulier n'a été observé, c'est-à-dire qu'aucun décès n'est survenu suite à l'application des ultrasons et qu'aucun signe clinique inhabituel n'a été constaté.

Concernant les observations des cerveaux avant le marquage, pour le groupe correspondant à la pression acoustique la plus faible, nous avons constaté de légers points hémorragiques (figure V-4.A) dans un cas seulement. Par ailleurs, 5 rats présentaient des zones rosées ou légèrement décolorées (figure V-4.B). Il pourrait s'agir d'une modification de la densité de cellules, néanmoins ceci n'a été retrouvé par les marquages DAPI que sur l'un des rats. Enfin, pour l'un des animaux l'hémisphère traité présentait une texture plus friable, sans que la cause n'ait été véritablement établie. Nous ne sommes pas en mesure de conclure quant à l'impact des ultrasons sur ces changements de coloration et de texture.

Pour le groupe de pression acoustique intermédiaire, des points hémorragiques ont été constatés pour 3 rats, et une hémorragie massive constatée sur l'un des rats (figure V-4.C). On

retrouve également des zones de décoloration ou de coloration rosée sur 3 des rats. Enfin, pour le groupe de pression acoustique la plus élevée, seul un rat présentait de faibles points hémorragiques. 2 des rats enfin présentaient des zones de coloration différente.

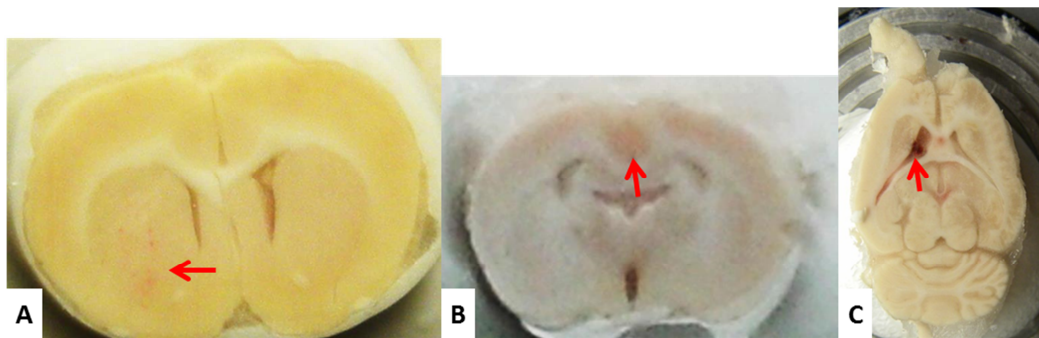


Figure V-4 : Exemples typiques d'observations macroscopiques. A. Pétéchies hémorragiques (flèche rouge). B. Zone anormalement rosée (flèche rouge). C. Hémorragie massive avec saignement dans le ventricule (flèche rouge)

Le tableau V-3 présente les résultats des observations des marquages DAPI, GFAP et Caspase-3. Des exemples d'images obtenues avec ces marquages sont présentés sur la figure V-5. Concernant les marquages DAPI (figure V-5.A), aucun changement n'a été remarqué excepté une diminution de la densité locale de noyaux pour un rat dans le groupe de plus basse pression. Cet effet a été corrélé avec une zone apparaissant rosée sur les observations macroscopiques.

| Pression | Temps | DAPI (Noyaux) | Caspase 3 (Apoptose) | GFAP (Activation astrocytaire) |
|----------|-------|---------------|----------------------|--------------------------------|
| 0.4 MPa | H1 | | | |
| | H24 | | + | |
| | J3 | | | |
| | J7 | | | + |
| | J10 | | + | + |
| | J14 | - | + | + |
| 0.7 MPa | H1 | | | |
| | H24 | | | |
| | J2 | | + | + |
| | J7 | | | + |
| | J12 | | | + |
| | J14 | | + | ++ |
| 1.4 MPa | H1 | | | |
| | H24 | | | |
| | J3 | | + | + |
| | J7 | | | |
| | J14 | | | + |

Tableau V-3 : Résultats pour les marquages DAPI, Caspase3 et GFAP. Une case verte indique qu'aucun changement n'a été noté. Une case rose indique un changement visible, le signe « + » indiquant une augmentation, le signe « - » une diminution. La seconde colonne indique les temps en heure ou jour entre tirs ultrasonores et sacrifice des animaux. Chaque ligne correspond a un individu unique.

Le marquage Caspase 3 (figure V-5.B) a révélé quelques cellules apoptotiques chez 6 rats, sans que cette observation n'ait été systématique ni qu'elle semble corrélée à la valeur de la pression. D'autre part, les marquages de l'apoptose n'étaient visibles que dans de petites régions très circonscrites, l'effet n'est donc pas massif. Ce marquage a par ailleurs été colocalisé dans 3 cas avec la GFAP, suggérant plutôt une apoptose astrocytaire que neuronale. Ces résultats seront à confirmer avec un deuxième marquage spécifique des neurones. Nous n'avons par ailleurs pas noté de différence en fonction du temps après application des ultrasons, puisque cet effet a été constaté à plusieurs temps différents.

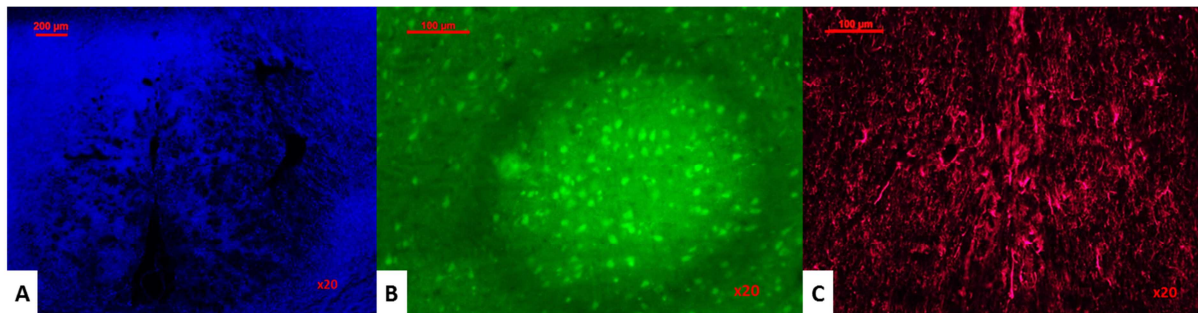


Figure V-5 : Exemples de marquages. A. En bleu (350 nm), les noyaux (DAPI). Les zones plus sombres indiquent un déficit de noyaux. B. Caspases 3 (vert, 488 nm). On peut noter un nombre accru de cellules apoptotiques au centre de l'image. C. Les astrocytes activés sont visibles en rouge (647 nm).

Enfin, le marquage de la GFAP (figure V-5.C) a révélé une activation astrocytaire pour les trois pressions étudiées. Nous avons noté de façon intéressante que cette activation survient pour chaque groupe au-delà de deux jours, et persiste jusqu'à 15 jours, confirmant les résultats obtenus entre temps par Jordao et al (Jordão et al. 2013). Pour le moment, nous n'avons pas étudié cette évolution pour des temps supérieurs, il est donc possible que l'activation astrocytaire persiste sur des durées supérieures à 15 jours. Il est également intéressant de noter que cette activation a été retrouvée sur des régions relativement étendues, et non seulement sur le trajet des ultrasons, ce qui suggère un phénomène relativement global.

Pour conclure, plusieurs effets intéressants ont été observés :

- Ces résultats confirment que l'application des ultrasons induit de l'apoptose, mais qu'elle est limitée à quelques cellules dans des régions très circonscrites. La colocalisation avec la GFAP suggère que cet apoptose est essentiellement astrocytaire, ainsi que l'avait montré une précédente étude (Hynynen et al. 2005). Il faudrait néanmoins confirmer ce résultat par un co-marquage spécifique des neurones.
- Nous avons noté une activation astrocytaire relativement marquée même pour des valeurs de pression pour lesquelles aucun dommage n'avait été observé en imagerie lors d'études précédentes de l'équipe. Cette activation apparaît seulement environ deux jours après l'application des ultrasons, et subsiste jusqu'à au moins 15 jours quels que soit les niveaux de pression utilisés pour perméabiliser la BHE (sauf peut-être les très faibles pressions). Ce résultat signe une réaction des cellules gliales, considérée comme une réponse du SNC face à une agression. Ceci suggère donc que l'application des ultrasons engendre un certain stress des tissus cérébraux. Il est

cependant difficile sur la base de ces seules données de savoir si cette réponse est le reflet de dommages irréversibles, ou bien un mécanisme de réparation bénin. En effet, l'activation astrocytaire peut prendre différentes formes en fonction de l'agression considérée. Ces réactions sont couramment classées en deux catégories : les activations survenant rapidement après le stress et permettant la cicatrisation et la neuroprotection, et les activations survenant généralement plus tardivement, mais pouvant résulter en l'inhibition de la régénération neuronale et en une neuroinflammation plus importante (Lee & MacLean 2015).

- Ces résultats confirment néanmoins l'intérêt de mener des études de la réponse des tissus cérébraux aux ultrasons à plus long terme que les heures suivant le traitement, en particulier si des applications répétées sont envisagées. En particulier, on notera que les durées ici en jeu sont bien plus longues que celles pendant lesquelles on constate une perméabilité accrue de la BHE (< 24 h). Des réactions biologiques continuent ou apparaissent même une fois la barrière refermée. Il conviendrait également d'étoffer cette étude afin de mieux caractériser le type d'activation engendré.
- Une dernière observation surprenante est que les rats traités avec la pression acoustique la plus importante semblent présenter moins de dommages que les rats du groupe de pression intermédiaire, notamment en termes d'hémorragies. Une hypothèse avancée pour expliquer ce résultat pourrait être qu'à cette pression, les bulles sont détruites très rapidement par les ultrasons et le temps d'interaction avec les cellules endothéliales est donc réduit. Néanmoins, cette explosion des bulles devrait induire des hémorragies massives que nous n'avons pas observées. Nous ne pouvons donc pour le moment pas véritablement expliquer ce résultat. L'expérience devra être répétée pour confirmer ou infirmer ce résultat, et essayer de comprendre l'effet en jeu.
- Enfin, des marquages supplémentaires ont été réalisés sur quelques animaux à titre prospectif. Ils sont présentés sur la figure V-6. Le marquage NeuN a été testé sur le rat présentant un déficit de DAPI dans une des zones. Aucune différence de population n'est observée sur le marquage NeuN dans cette zone, confirmant que cette baisse de densité cellulaire n'est sans doute pas une baisse du nombre de neurones (figure V—6.A). Les premiers résultats obtenus avec des marquages Iba1 ont montré dans un premier temps une activation microgliale conjointe à l'activation astrocytaire, confirmant les signes d'une réaction neuroinflammatoire (figure V-6.C). Par ailleurs, des cellules de forme ronde marquées Iba1 ont été observées dans le parenchyme cérébral chez un rat (figure V-6.B), ce qui semble indiquer l'infiltration de macrophages circulant. Ceci tend à confirmer des résultats précédemment observés et invoqués pour expliquer la disparition des plaques amyloïdes suite à une application répétée de la procédure de perméabilisation de la BHE (Jordão et al. 2013).

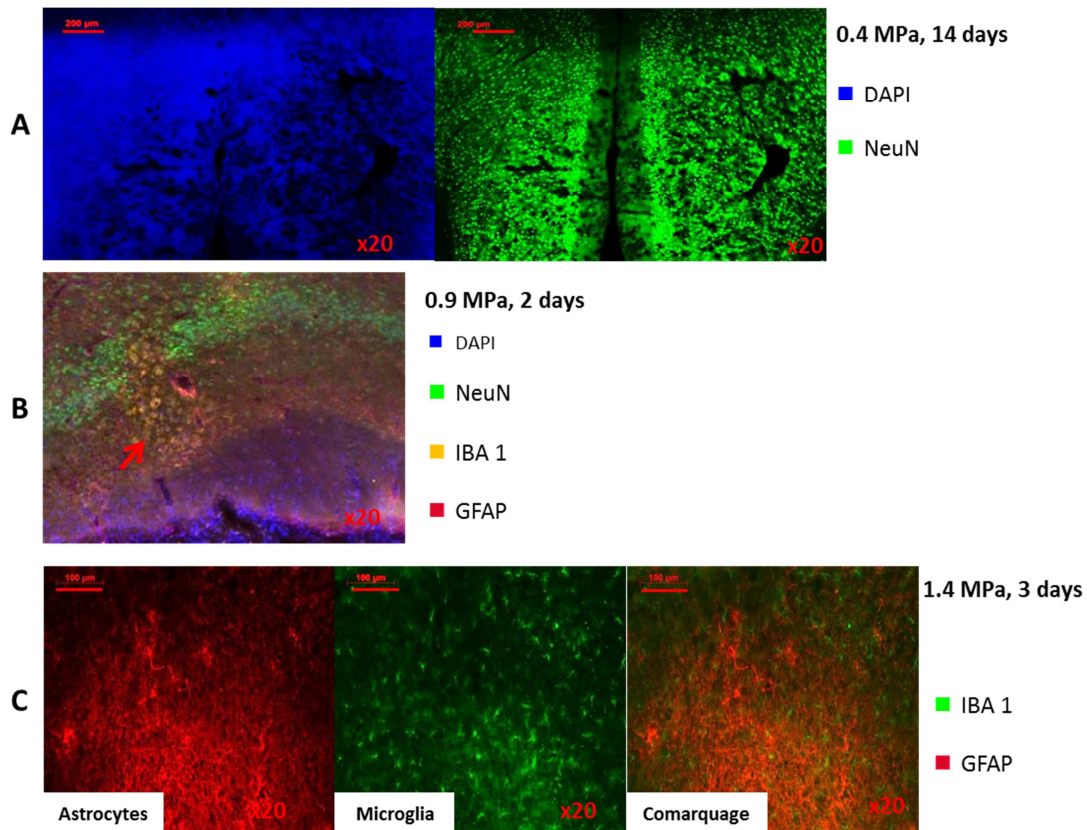


Figure V-6 : Marquages supplémentaires. A. En bleu (350 nm), DAPI montrant un déficit de cellules (zones sombres). En vert (488 nm), NeuN confirmant que les cellules déficitaires ne sont pas des neurones. B. Quadruple marquage. On observe en particulier des cellules de formes rondes marquées Iba1 (flèche rouge, en orange, 594 nm), étant probablement des macrophages circulant. C. Marquage Iba1 (microglie, vert, 488 nm), GFAP (rouge, 647 nm), et fusion des deux images. On observe une activation microgliale conjointe à l'activation astrocytaire.

Cette étude histologique préliminaire a donc permis d'obtenir des résultats intéressants. Nous envisageons de la répéter sur un nombre de rats plus importants et jusqu'à des temps plus longs, afin de confirmer les effets obtenus, avec une meilleure co-localisation des tirs US avec les coupes histologiques. Etudier les effets au-delà de 15 jours, observer leur disparition et comprendre leur dangerosité permettra d'envisager plus sereinement une translation vers des applications cliniques. Chercher les paramètres acoustiques permettant à la fois d'ouvrir efficacement la BHE tout en minimisant ces effets serait aussi intéressant à l'avenir.

V-2. Etude du passage de protéines du cerveau vers le sang

V-2.1. Motivations

La perméabilisation de la BHE par ultrasons offre de bonnes perspectives en permettant une augmentation significative de la quantité de molécules délivrées au cerveau. A ce titre, la délivrance de différents agents du système sanguin vers le cerveau a déjà été largement étudiée et démontrée. Néanmoins, rien ne garantit que le passage soit unilatéral, et à notre connaissance le passage de molécules du cerveau vers le sang suite à une perméabilisation de la BHE n'a pas encore été étudié. En effet, une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène est l'induction par les ultrasons d'une ouverture des jonctions serrées, permettant un passage paracellulaire des molécules (Marty et

al. 2012; Sheikov et al. 2008). Dans ce cas, le mouvement des molécules du sang vers le parenchyme cérébral serait principalement dû à une diffusion passive entre les deux compartiments. Sous cette hypothèse d'une ouverture physique de la BHE, les composés peuvent donc diffuser d'un compartiment à l'autre de façon bilatérale. Ceci signifierait que des biomarqueurs spécifiques du cerveau pourraient tout à fait franchir la BHE perméabilisée et être présents dans le compartiment sanguin suite à l'application des ultrasons.

Comme nous l'avons rappelé, la perméabilisation de la BHE offre un formidable potentiel dans le traitement de nombreuses pathologies cérébrales, en particulier des tumeurs. La barrière hémato-tumorale (BHT) restreignant l'accès à la tumeur des chimiothérapies, les stratégies proposées actuellement sont majoritairement la radiothérapie et la chirurgie, des méthodes extrêmement invasives pouvant engendrer des dommages significatifs aux tissus cérébraux, résultant en d'importants dégâts neurologiques chez le patient. Des études ont déjà montré que la perméabilisation de la BHE par ultrasons permettait d'augmenter significativement la quantité de chimiothérapie délivrée dans des tumeurs cérébrales (Liu et al. 2012)(Couture et al. 2014), et que cette méthode permettait d'améliorer sensiblement la survie chez des modèles animaux de glioblastome (Aryal et al. 2013).

Dans la perspective d'une transposition de ces résultats vers des applications cliniques, l'étude du passage de composés du cerveau vers le sang suite à l'application des ultrasons peut être très intéressante puisqu'on peut imaginer que des marqueurs tumoraux soient libérés dans la circulation sanguine, ce qui pourrait ouvrir la voie à de nouvelles méthodes de diagnostic. En effet, la méthode standard de diagnostic des tumeurs cérébrales est actuellement, outre les méthodes d'imagerie qui ne renseigne pas sur la composition protéique des tissus suspects, la biopsie stéréotaxique intracrânienne (Verploegh et al. 2015). Cette technique nécessite une intervention chirurgicale lourde et invasive, sous anesthésie générale, et qui présente un certain nombre de risques (infection, hémorragie, difficulté d'accès à certaines tumeurs...). Etre en mesure de réaliser la caractérisation de la tumeur par des prises de sang suivant une perméabilisation de la BHE, procédure minimalement invasive, pourrait donc être une alternative extrêmement intéressante pour la sécurité et le confort du patient.

Je présente ici une première expérience réalisée dans le but d'étudier l'éventuel passage de protéines d'une tumeur cérébrale vers le sang. Dans un premier temps, le modèle de tumeur choisi et son induction seront décrits. Je présente ensuite le protocole utilisé pour perméabiliser la BHE et prélever les échantillons de sang, ainsi que les techniques utilisées pour analyser ces échantillons. Enfin je présente les premiers résultats de cette étude.

V-2.2. Choix et induction du modèle animal

V-2.2.a) Choix du modèle 9L

Concernant le choix du modèle de tumeur, nous souhaitons qu'elle possède une croissance suffisamment rapide pour atteindre le volume souhaité sans que l'animal ne soit trop volumineux pour rentrer dans le scanner IRM (< 400 g), et qu'elle soit circonscrite afin de faciliter son ciblage par les ultrasons. Enfin, cette étude étant prospective, nous souhaitons utiliser un modèle de tumeur syngénique, ne nécessitant pas l'utilisation d'animaux immunodéprimés, plus fragiles.

Les tumeurs 9L sont un modèle de gliosarcome du rat, très largement utilisé pour de nombreuses recherches (Barth & Kaur 2009) et donc très bien caractérisé. Ce modèle a initialement été produit chez des rats Fischer, il est donc syngénique. Il présente en outre une croissance rapide, et les tumeurs ne sont pas infiltrantes. C'est donc le modèle que nous avons retenu pour notre étude.

V-2.2.b) Induction du modèle animal

Les tumeurs ont été induites chez 9 rats (150-170 g).

Une lignée cellulaire 9L a été cultivée dans le laboratoire de culture cellulaire de Neurospin sur un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, Etats-Unis), complété de 10 % de sérum de veau nouveau-né. Elles ont été incubées à 37 °C, dans une atmosphère à 5 % de CO₂. La culture cellulaire et l'injection stéréotaxique des tumeurs a été réalisée par Françoise Geffroy.

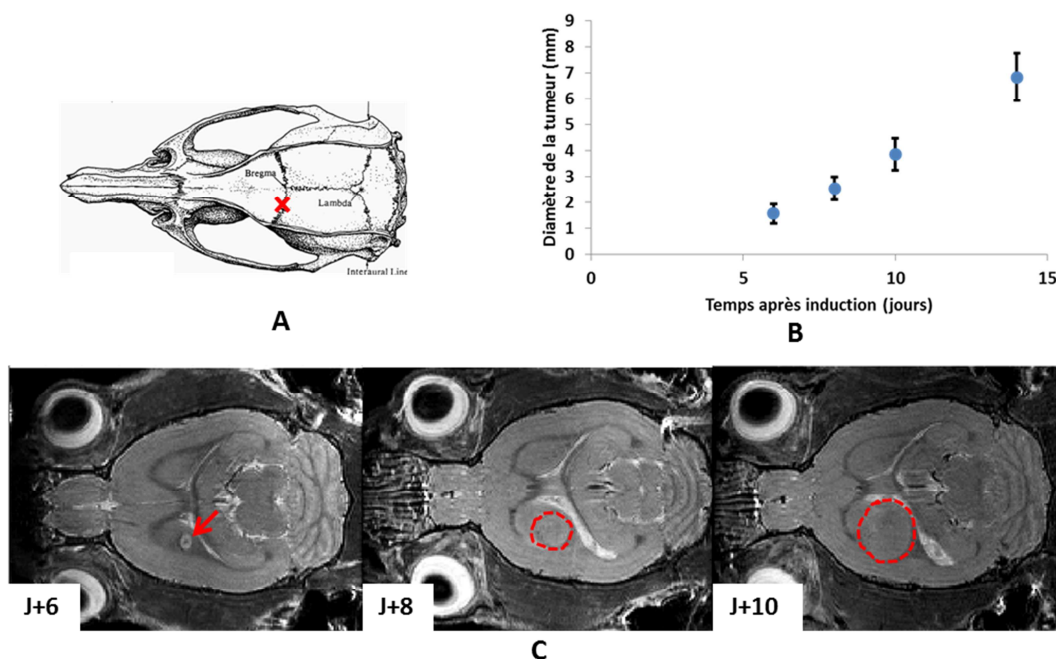


Figure V-7 : Implantation et suivi de croissance des tumeurs. A. La croix rouge désigne le site d'injection des cellules tumorales. B. Evolution du diamètre tumoral après induction. C. Exemple d'images pondérées T₂ acquises sur le même rat pour le suivi de la croissance tumorale. La flèche rouge, et les pointillés désignent la tumeur.

Pour l'induction des tumeurs, les animaux sont préalablement anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine/xylazine (100 mg.kg⁻¹, 10 mg.kg⁻¹). L'anesthésie est complétée par une analgésie, réalisée par une injection sous-cutanée de Buprécare (0,03 mg.kg⁻¹). L'animal est alors installé dans un cadre de stéréotaxie, puis une incision est pratiquée sur la peau du crâne afin de découvrir l'os. Cette opération permet de repérer le bregma, utilisé comme repère anatomique pour définir le site d'injection. Nous avons dans ce cas choisi d'induire les tumeurs dans le striatum gauche (figure V-7.A). Le crâne est alors percé à l'aplomb du site d'induction, puis un volume de 5 µL de la suspension cellulaire (20 millions de cellules.mL⁻¹, soit environ 100000 cellules)

est injecté à l'aide d'une seringue Hamilton à 4,5 mm de profondeur. Le crâne est alors rebouché avec de la cire, puis l'incision de la peau est suturée.

Nous avons effectué un suivi longitudinal de la croissance tumorale par l'acquisition d'images pondérées T_2 comme l'illustre la figure V-7. Pour chaque image, le diamètre de la tumeur a été mesuré en sa coupe centrale. Nous avons choisi de démarrer notre étude sur des tumeurs de 6 mm de diamètre, qui peuvent être aisément ciblées par ultrasons, et garantissent un bon taux de survie des animaux sur la durée ultérieure de la manip avant euthanasie. Cette taille a nécessité une période de croissance de 15 jours. Conjointement aux acquisitions IRM, le poids des animaux a été relevé et leur bonne activité observée afin de garantir le respect des règles d'éthique.

V-2.3. Protocole expérimental

V-3.2.a) Perméabilisation de la BHE

L'ensemble de l'expérience est réalisé hors IRM, et la perméabilisation de la BHE est réalisée selon le protocole décrit au paragraphe IV-1.1, en déplaçant le transducteur manuellement au-dessus de la tumeur durant 4 minutes afin d'en couvrir la totalité, la pression acoustique choisie étant de 1 MPa. Du fait de l'implantation des tumeurs, même après la période de croissance de 15 jours, il résulte sur le crâne une cicatrice due à l'incision qui peut potentiellement gêner la propagation des ultrasons, notamment à cause d'un couplage moins bon du transducteur. Pour cette raison, nous avons volontairement choisi une valeur de pression élevée afin de garantir l'obtention d'une perméabilisation. Pour générer les ultrasons, nous avons utilisé le transducteur monoélément 1,5 MHz

| Temps après perméabilisation (h) | 3 | 5,5 | 10 | 20 | 48 | 72 |
|----------------------------------|---|-----|----|----|----|----|
| Nombre d'animaux tumeur | 5 | 3 | 5 | 3 | 3 | 5 |
| Nombre d'animaux contrôle | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 |

Tableau V-4 : Répartition des animaux pour les prélèvements sanguins à différents temps après perméabilisation de la BHE.

Afin d'analyser les molécules éventuellement transférées dans le compartiment vasculaire, Erwan Selingue et moi avons effectué des prises de sang dans la veine de la queue. Le sang est prélevé puis centrifugé ($1500 \text{ tours.min}^{-1}$, 10 min) afin de récupérer le sérum. Le sérum est ensuite stocké à -80°C avant de procéder à son analyse. Les animaux sont divisés en trois groupes : un groupe contrôle pour lequel aucune tumeur n'a été implanté ($n = 3$), et deux groupes possédant des tumeurs ($n = 4$, $n = 5$). Pour tous les animaux, un prélèvement de sang au niveau de la veine caudale est effectué avant le protocole de perméabilisation afin d'être utilisé comme référence. 3 échantillons sont ensuite prélevés à différents temps après la perméabilisation. Le tableau V-4 résume les temps de prélèvements en fonction des groupes. L'un des animaux du groupe 5,5/20/72h étant décédé à l'issue du tir, il a été retiré de l'étude. Enfin, les cerveaux de tous les animaux ont été prélevés après la prise du dernier échantillon sanguin. Pour procéder à leur analyse, ils sont congelés par vapeur d'azote. Cette analyse de cerveaux avait deux buts principaux :

- Rechercher s'il était possible d'établir un profil protéomique qui soit spécifique de la tumeur (par rapport au tissu sain), afin notamment d'identifier de potentiels biomarqueurs. Cette analyse a été comparée entre les différents rats.
- Chercher à voir si l'application des ultrasons pouvait induire une modification du profil protéomique, qui signerait une réaction des cellules du SNC.

L'ensemble des analyses a ensuite été réalisé à Clinattec (Grenoble, France). par Matthieu Dreyfus et Adrien Mombrun de l'équipe du professeur François Berger.

V-3.2.b) Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse est une technique de chimie analytique permettant d'identifier la nature et la quantité de molécules présentes dans un échantillon. Elle est aujourd'hui largement utilisée dans un nombre de domaines très variés, et en particulier en biochimie où elle permet de détecter des protéines de façon très sensible. Le but de ce paragraphe est d'introduire de façon succincte cette technique pour faciliter la lecture du manuscrit.

Le principe de base de la spectrométrie de masse consiste à discriminer des ions que l'on aura portés en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse sur charge. On peut généralement décrire une expérience de spectrométrie de masse par trois étapes principales :

- L'ionisation de l'échantillon, qui consiste à porter les molécules en phase gazeuse et à les ioniser. Différentes techniques peuvent être utilisées.
- La séparation des ions produits. Il s'agit de mesurer, par différentes techniques, le rapport masse sur charge des ions produits, afin d'être en mesure de les séparer. On peut par exemple citer la méthode dite TOF (Time Of Flight) ou « temps de vol » utilisée pour les analyses présentées ici. Le principe consiste à accélérer dans un premier temps les ions dans une chambre d'accélération. Ils vont alors acquérir une vitesse dépendant directement de leur rapport masse sur charge. A l'issue de cette phase d'accélération, ils évoluent librement jusqu'au détecteur dans le tube de vol. Le détecteur compte alors le nombre d'ions reçus en fonction du temps. En effet, le temps mis pour parcourir le tube de vol dépend uniquement de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération, c'est-à-dire du rapport masse sur charge.
- La détection des ions. Il s'agit de compter le nombre d'ions pour chaque rapport masse sur charge, afin de reconstruire le spectre de masse.

La technique d'ionisation utilisée pour les analyses de serum et de cerveaux présentées dans ce manuscrit est nommée MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization). La première étape consiste en l'ajout d'une matrice à l'échantillon. L'ensemble échantillon/matrice est ensuite soumis à un rayonnement laser, qui entraîne sa vaporisation et son ionisation. La matrice a pour rôle d'absorber l'énergie du laser pour ensuite la transmettre à l'échantillon, facilitant son passage en phase gazeuse et son ionisation. L'un des avantages de cette technique est qu'elle permet une ionisation dite « douce », c'est-à-dire que contrairement à d'autres techniques dites « dures » elle limite la fragmentation des molécules au moment de leur ionisation. Ceci est particulièrement intéressant pour l'analyse de grosses molécules relativement fragiles telles que les protéines, puisque leur intégrité est ainsi conservée ce qui facilite leur discrimination. D'autre part, cette technique peut être utilisée pour réaliser de l'imagerie de certains tissus. En effet, une coupe

histologique correctement préparée peut être balayée par le laser. On peut ainsi réaliser un spectre de masse en chaque point vaporisé et donc réaliser des cartes de la composition protéique de ce tissu.

V-3.2.c) Analyse des cerveaux

Les cerveaux sont découpés en tranches de 6 à 12 microns, puis déposés sur des lames de verre ITO, qui possèdent la particularité d'être conductrices. Ceci va permettre de réaliser de l'imagerie MALDI décrite au paragraphe précédent. Les images ont été réalisées avec une résolution latérale de 100 µm.

V-3.2.d) Analyse des serums

L'objectif principal de ces analyses était d'identifier le passage de marqueurs cérébraux ou tumoraux dans le sang suite à la perméabilisation de la BHE. Pour ce faire, nous avons décidé d'effectuer une analyse sans a priori sur la nature de ces marqueurs.

Néanmoins, un grand nombre de protéines non-spécifiques des tissus cérébraux sont présentes dans le serum. On peut citer en particulier les produits de l'hémolyse (hémoglobine, albumine, ...) qui peuvent représenter jusqu'à 90% de la masse protéique du serum et vont masquer les protéines d'intérêt. Il s'agit donc dans un premier temps d'éliminer ces molécules non-spécifiques. Nous recherchons dans ce cas des protéines ayant pu traverser une BHE perméabilisée. Il s'agit donc a priori de molécules de taille restreinte. Les laboratoires de Clnatec utilisent une technique basée sur l'emploi de nanoparticules magnétiques sur lesquelles sont greffés un certain nombre de groupe chimique. La nature et la disposition de ces groupes permet de trier efficacement les protéines en fonction de leur taille et de leur propriétés chimiques avant analyse par spectrométrie de masse (Zaccaria et al. 2015).

Une analyse statistique des spectres permet ensuite de les comparer entre eux et d'identifier d'éventuelles différences entre les groupes.

V-3.2.e) Résultats

Pour un même animal, les profils protéomiques obtenus dans la tumeur et dans la zone contrôle sont significativement différents, ce qui permet de les séparer correctement (figure V-8.C et D). Néanmoins, une comparaison des spectres tumoraux moyens entre les différents animaux a montré une grande variabilité, ce qui rend difficile l'identification de biomarqueurs spécifiques. Cette hétérogénéité est certainement expliquée par l'hétérogénéité phénotypique des tumeurs. En effet, nous avons observé entre les rats de grandes différences dans la taille des tumeurs, ainsi que de petites différences dans leur localisation, malgré l'effort mis pour toujours les injecter aux mêmes coordonnées stéréotaxiques.

D'autre part, aucune modification du profil protéomique dû aux ultrasons n'a été notée dans les tissus observés. Bien que nous ne puissions garantir avec certitude avoir examiné la bonne zone, ce résultat est extrêmement encourageant pour l'innocuité de la procédure. En effet, pour d'autres traitements tels que la radiothérapie, les mêmes analyses font clairement apparaître une modification de ce profil protéomique le long du faisceau de rayons radio.

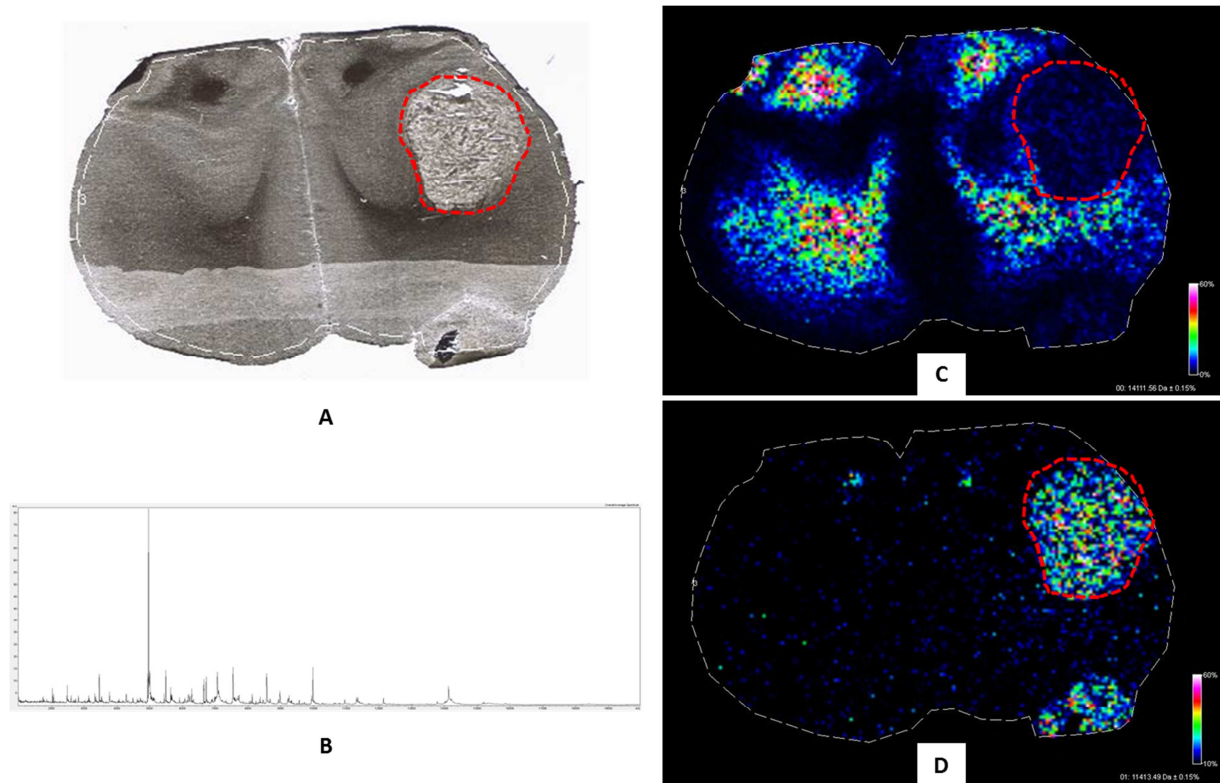


Figure V-8 : Exemples d'images MALDI obtenues pour une coupe de cerveau. A. Image de la coupe en lumière blanche. La tumeur est délimitée par les pointillés rouges. B. Le spectre de masse moyen obtenu sur l'ensemble de la coupe. C. Exemple d'une carte de concentration d'une protéine spécifique des tissus sains. D. Exemple d'une carte de concentration d'une protéine spécifique de la tumeur.

Pour l'analyse des échantillons sanguins, la première étape du traitement statistique a consisté à identifier les pics significativement différents entre les différents échantillons. Pour chaque nanoparticule de séparation utilisée, les concentrations correspondant aux deux pics les plus significatifs ont alors été tracées l'une en fonction de l'autre (figure V-9). Sur ce type de graphique, si les points d'un même groupe sont groupés et bien séparés des autres groupes, on peut alors conclure à une différence. Pour l'ensemble des échantillons tumeurs analysés, la majorité des pics discriminants présentaient des coefficients de variation relativement importants, ce qui rend difficile l'analyse statistique. Néanmoins, une différence assez nette a été notée pour les prélèvements effectués 24 heures après la perméabilisation. Ces travaux étant très prospectifs, les protéines impliquées n'ont pour l'instant pas été identifiées. De prochaines expériences se focaliseront donc plus sur ces temps en particulier. On retrouve déjà que les effets protéomiques sont plus forts après 20 h qu'immédiatement après les ultrasons ce qui signe une réaction biologique lente et relativement durable.

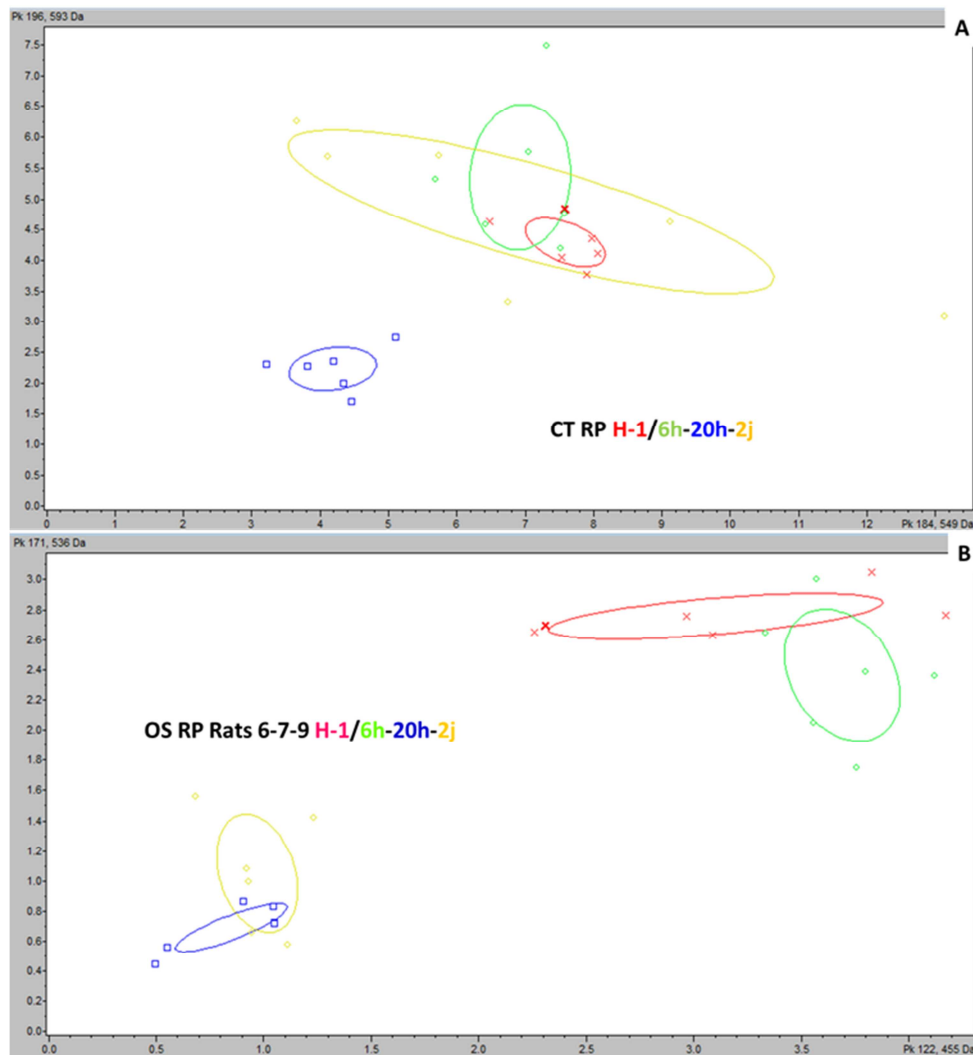


Figure V-9 : Exemples d'une analyse de sérums. Pour l'une des nanoparticules utilisées pour la séparation des protéines, les deux pics les plus discriminants sont identifiés. Pour chaque rat, la quantité de l'un des pics (ici 593 Da pour A et 536 Da pour B) est tracée en fonction de la quantité du deuxième pic (ici 549 Da pour A et 455 Da pour B). On peut voir que les échantillons prélevés à 20h (en bleu) pour A (resp. 20 et 2 jours en bleu et jaune pour A) sont bien séparés des autres échantillons, ce qui marque un changement de la concentration sanguine des protéines considérées qui est significatif et spécifique du temps considéré.

D'autre part, la faible taille de la cohorte utilisée pour cette étude ne permet pas de conclure de façon définitive. En effet, multiplier le nombre d'animaux permettrait certainement d'augmenter la probabilité d'obtenir des tumeurs plus homogènes. Il faudrait d'autre part effectuer plus de prélèvements préalablement à la perméabilisation afin d'obtenir une ligne de base plus stable. Ces premiers résultats sont néanmoins encourageants et laissent penser qu'il existe effectivement une modification du profil protéique sérique suite à l'application des ultrasons. Nous ne sommes néanmoins pour le moment pas en mesure de dire s'il vient d'un relargage de molécules du cerveau ou s'il est la signature d'une réaction de réparation suite à l'application des ultrasons, telle que nous l'avons vu au paragraphe V-1.

V-3. Perspectives : spectroscopie par IRM suite à une perméabilisation de la BHE

Nous avons vu que l'étude histologique réalisée avait permis de mettre en évidence un certain nombre de phénomènes significatifs d'une neuroinflammation, notamment l'activation de cellules gliales. La principale limitation de l'histologie est qu'elle nécessite le sacrifice des animaux, et permet uniquement une étude des tissus fixés.

Afin de pouvoir étudier *in vivo* l'effet de la perméabilisation de la BHE par ultrasons, la spectroscopie par IRM représente un outil très intéressant puisqu'elle permet de quantifier *in situ* un certain nombre de métabolites cérébraux, et donne donc accès à des informations physiologiques fines *in vivo*. Elle permet ainsi un suivi longitudinal des éventuelles modifications induites par les ultrasons.

Dans le but de compléter les informations apportées par l'histologie, nous avons donc réalisé une étude prospective de la faisabilité de la spectroscopie IRM suite au protocole d'ouverture BHE.

V-3.1. Rappels utiles sur la spectroscopie par IRM

Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre introductif, la fréquence de Larmor des noyaux d'hydrogène est en première approximation proportionnelle à l'intensité du champ magnétique externe B_0 . En pratique, cette fréquence est également affectée par l'environnement des protons considérés par deux phénomènes : le déplacement chimique et le couplage de spins.

De façon très simplifiée, le déplacement d'un électron soumis à un champ magnétique externe va engendrer un champ magnétique local au voisinage de la particule. Ainsi, lorsqu'une molécule est soumise au champ \vec{B}_0 , le déplacement des électrons dans ses orbitales moléculaires va créer de faibles champs magnétiques locaux B_e qui s'ajoutent au champ magnétique externe. Les protons situés au voisinage vont donc être soumis à un champ magnétique $B_0 + B_e$ ce qui modifie légèrement leur fréquence de résonance : on parle de déplacement chimique. La valeur de ce déplacement dépend à la fois de la nature des noyaux voisins des protons au sein de la molécule, mais également de la position des protons par rapport à ces noyaux.

Lorsque deux spins non nuls sont présents au sein d'une même molécule, il peut également exister une interaction entre ces deux spins appelée couplage spin-spin qui va engendrer la modification de la fréquence de résonance. Ce phénomène est caractérisé par la constante de couplage, qui dépend essentiellement de la distance entre les spins.

Chaque molécule va donc présenter un spectre en fréquence qui lui est propre, ce qui permet de l'identifier à partir d'un signal RMN. Néanmoins, au sein d'un organisme vivant, la grande majorité des protons est contenue dans les molécules d'eau, ce qui rend difficile la détection des spectres des autres molécules. Il est donc nécessaire de supprimer le signal de l'eau préalablement à l'acquisition d'un spectre RMN. Différentes stratégies sont disponibles, nous avons utilisé le module VAPOR (Tkac et al. 1999).

D'autre part, un spectre est obtenu à partir du signal RMN global d'un échantillon, mais ne contient pas d'information de localisation. Lorsque l'on souhaite caractériser la composition d'une

zone anatomique donnée, il est donc nécessaire de recourir à des techniques permettant de choisir la région dont on souhaite réaliser le spectre. Plusieurs méthodes ont été proposées, nous décrivons ici brièvement la séquence PRESS (Point RESolved Spectroscopy)(BOTTOMLEY 1987) retenue pour acquérir nos données. Nous noterons x, y et z les trois directions de l'espace. Après une étape de suppression du signal de l'eau, une première coupe est sélectionnée grâce à l'application conjointe d'une impulsion RF 90° et d'un gradient selon x. Dans un deuxième temps, une seconde coupe orthogonale à la première est sélectionnée grâce à une impulsion 180° et un gradient selon y. Enfin, une troisième coupe orthogonale aux deux précédentes est sélectionnée grâce à une deuxième impulsion 180° et un gradient selon z. Au final, seul le volume résultant de l'intersection des trois coupes contribuera au signal RMN.

V-3.2. Matériel et méthodes

Le protocole de perméabilisation utilisé est identique à celui présenté au paragraphe IV-1.2, en rajoutant des séquences de spectroscopie. Un rat (120 g) a été utilisé, avec une pression au point focal de 0,8 MPa.

Les acquisitions ont été paramétrées avec l'aide de Fawzi Boumezbeur. Un spectre de référence pré-perméabilisation est alors réalisé en utilisant une séquence PRESS avec les paramètres suivants : $TE_1/TE_2 = 12/12$ ms, $TR = 2500$ ms, $\text{offset} = -2$ ppm, taille du voxel = $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$, 256 moyennes. Le voxel est placé de façon à être circonscrit à la tache focale visible sur les images de phase ARFI.

Pour confirmer la perméabilisation, un chélate de Gd (AGuiX, NanoH, France) est injecté via bolus à la place du Dotarem® (0,5M, $1,6 \text{ mL.kg}^{-1}$, 2 s). En raison de l'injection de Gd, il n'est pas possible d'effectuer un spectre immédiatement après la perméabilisation.

Des spectres sont alors acquis dans la zone de perméabilisation 24h et 7 jours après l'application des ultrasons. Un soin particulier est apporté au positionnement du voxel d'intérêt afin de le replacer dans la même région anatomique sur la base d'une image pondérée T_2 .

Les données ont ensuite été analysées par Fawzi Boumezbeur grâce au logiciel LCModel.

V-3.3. Résultats

La figure V-10 présente le spectre obtenu 24 h après application des ultrasons. On peut observer différents pics dont celui de la créatine, ce qui indique que le volume imagé et l'antenne utilisée permettent d'acquérir des spectres de qualité acceptable. Les pics pour différents métabolites ont été ajustés avec LCModel, le résultat est visible en rouge sur le spectre. Les concentrations de chaque métabolite ont été normalisées par la concentration en créatine afin de pouvoir être comparées, les résultats sont présentés dans le tableau V-4.

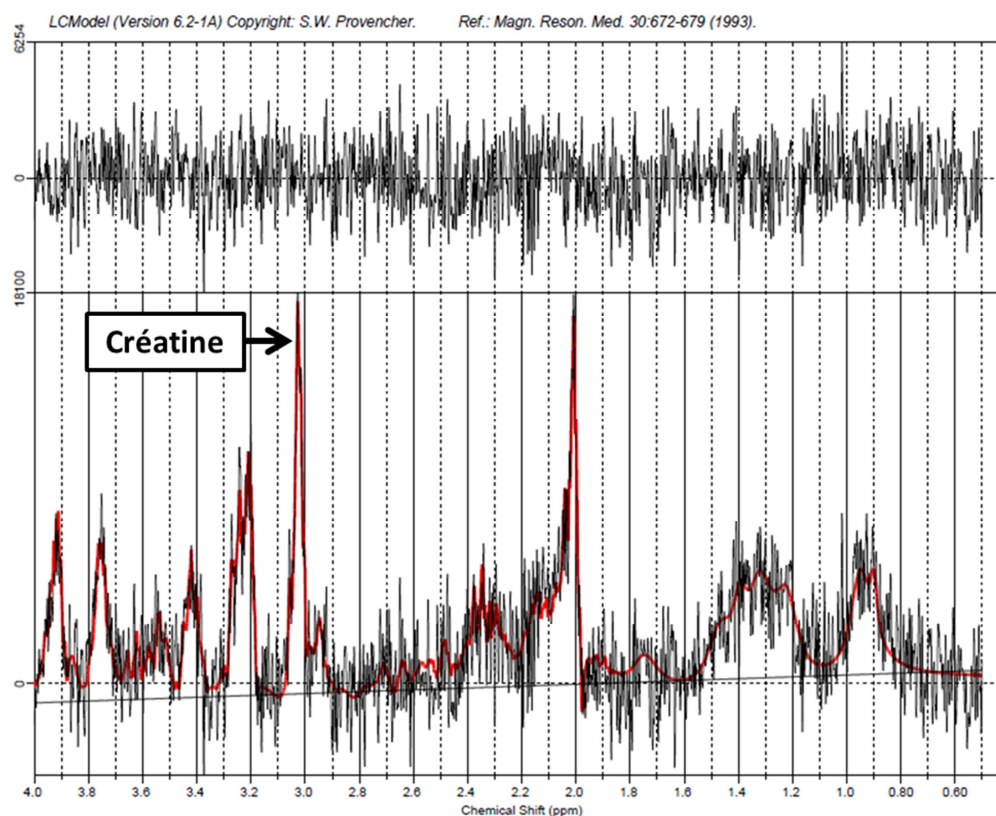


Figure V-10 : Spectre obtenu 24h après perméabilisation. La partie supérieure représente les résidus (les données soustraites de l'ajustement). La partie inférieure de l'image représente le spectre obtenu (en noir), et le spectre ajusté par LCMModel (en rouge). Le pic de la créatine est indiqué.

Sur ces données préliminaires, on peut noter une baisse du N-acétylaspartate (NAA), ce qui est généralement interprété comme le signe d'une altération ou d'une perte neuronale (Moffett et al. 2007). On peut également constater une augmentation de l'inositol et du glutamate 7 jours après l'application des ultrasons. Ceci pourrait être dû à une activation des cellules gliales, ce qui confirmerait les résultats observés en histologie avec une activation astrocytaire marquée à moyen et long terme après l'application des ultrasons.

| Temps après perméabilisation | J0 | J1 | J7 |
|------------------------------|------|------|------|
| NAA+NAAG | 7,5 | 6,2 | 6,9 |
| Inositol | 5,6 | 5,5 | 7,8 |
| Glx | 11,2 | 10,8 | 14,0 |
| Glutamate | 8,1 | 8,1 | 10,4 |
| Choline | 1,1 | 1,2 | 1,3 |

Tableau V-5 : Concentration relative (normalisée par la concentration en créatine) pour différents métabolites en fonction du temps après perméabilisation. NAA désigne le N-acétylaspartate.

Ces résultats préliminaires sont néanmoins à nuancer par la faible qualité de ces premières acquisitions :

- Nous pouvons noter sur le spectre que le rapport signal sur bruit est relativement faible, il a été estimé à 5 par LCModel, ce qui est légèrement en-dessous de la limite basse des spectres généralement inclus dans une étude. Afin d'améliorer le RSB, il pourrait être envisagé d'augmenter le nombre de moyennes. Néanmoins, ceci suppose d'augmenter le temps d'acquisition des spectres (actuellement déjà à 10 min). Nous suggérons également qu'une amélioration de l'antenne RF, actuellement en cours, devrait augmenter significativement le RSB.
- D'autre part, la largeur à mi-hauteur des pics estimée également par LCModel est assez importante. Ceci se traduit par des spectres moins bien résolus, ce qui empêche d'en faire une analyse précise. L'hypothèse avancée pour expliquer cet élargissement est une trop grande inhomogénéité de champ magnétique au sein du voxel de spectroscopie. Nous suggérons donc pour de prochaines expériences d'apporter un soin encore plus particulier au réglage du « shim ».
- Il apparaît également sur les spectres l'existence de courants de Foucault qui se traduisent par des pics dont la forme n'est pas lorentzienne. Leur origine n'a pour le moment pas été déterminée avec certitude.
- Enfin, il faudrait également multiplier le nombre d'animaux inclus dans l'étude afin de confirmer les premières tendances observées.

V-4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons rappelé les principaux effets observés à la suite de la perméabilisation de la BHE.

Nous avons également présenté les résultats d'une étude histologique à court et moyen terme après application des ultrasons. Nous avons noté une activation des cellules gliales, en particulier les astrocytes, persistant jusqu'à 15 jours après la perméabilisation. Ceci signifie que la réversibilité de la perméabilité capillaire ne suffit peut-être pas à la sécurité de la procédure, et que malgré l'absence de signes cliniques il existe des effets au niveau cellulaire persistants durant un temps relativement long. Ces études seront à approfondir.

Des résultats concernant une étude préliminaire cherchant à prouver le passage de marqueurs tumoraux du cerveau vers le sang ont été présentés. Elle a permis de montrer que l'imagerie MALDI permettait de discriminer correctement la tumeur du tissu sain. D'autre part, bien que des études supplémentaires soient nécessaires, il semblerait que le profil protéique du sérum soit modifié 24h après l'application des ultrasons. Les protéines impliquées n'ont pas encore été identifiées.

Enfin, nous avons pu réaliser une preuve de concept de spectroscopie par IRM suivant la perméabilisation de la BHE montrant des résultats concordants avec l'histologie et encourageants mais nécessitant d'être reproduit dans de futures études.

VI. Etude de la diffusion d'agents de contraste dans les tissus cérébraux suite à une perméabilisation de la BHE

Nous avons rappelé dans les chapitres précédents l'obstacle que représentait la BHE pour la délivrance de molécules au SNC, ainsi que la façon de la perméabiliser transitoirement grâce aux ultrasons. Néanmoins, une fois que les molécules ont pénétré dans les tissus cérébraux, leur diffusion est fortement restreinte du fait de la complexité du parenchyme cérébral. Il est donc essentiel de pouvoir caractériser et quantifier les paramètres régissant cette diffusion lorsque l'on souhaite contrôler la distribution d'agents délivrés au cerveau. Dans ce chapitre, nous présentons une étude de la diffusion d'agents de contraste de différentes tailles au sein des tissus cérébraux *in vivo* suite à une perméabilisation de la BHE par ultrasons grâce à la méthode introduite par Benjamin Marty au cours de sa thèse (Marty 2012). Nous introduisons dans un premier temps le contexte de ce travail, puis nous présentons les méthodes utilisées pour calculer les relaxivités des différents agents de contraste. Nous présentons ensuite le protocole utilisé pour mesurer la diffusion libre de ces molécules, puis la méthodologie mise en œuvre pour étudier leur diffusion au sein du SNC.

VI-1. Contexte et motivations

VI-1.1. Processus de diffusion dans le milieu extracellulaire des tissus cérébraux

La diffusion de molécules dans le cerveau se fait essentiellement dans l'espace extracellulaire (EEC), défini comme l'espace existant entre les différentes cellules constituant les tissus cérébraux. La diffusion au sein de cet EEC est partiellement entravée par rapport à une diffusion libre, en raison de deux effets principaux :

- Le volume de l'EEC représente seulement 15 à 30 % de l'ensemble du volume cérébral, cette fraction pouvant même être réduite à 5 % dans certaines conditions pathologiques (Syková & Nicholson 2008).
- Le cerveau est constitué d'un enchevêtrement très dense de cellules cérébrales, principalement les neurones et les cellules gliales, et de capillaires sanguins (figure VI-1). L'espace moyen entre les différentes parois cellulaires est ainsi de quelques dizaines de nanomètres (Thorne & Nicholson 2006), ce qui va fortement ralentir la diffusion de molécules au sein de l'EEC.

La connaissance de ces propriétés de diffusion s'avère très importante pour un certain nombre d'applications. Dans un premier temps, elle permet de mieux comprendre les mécanismes de communication intercellulaire par neurotransmetteurs dont une partie du transport se fait par diffusion (Sykova 2014), et peut être indicative de pathologies cérébrales (Syková 2004). Dans un second temps, elle est importante lorsque l'on cherche à délivrer des molécules thérapeutiques ou diagnostiques au cerveau, puisque ces propriétés de diffusion vont en grande partie gouverner la biodistribution de ces composés au sein des tissus cérébraux. Ainsi, afin de caractériser cette entrave à la diffusion, une grandeur sans dimension appelée tortuosité λ a été introduite (Nicholson & Phillips 1981), calculée de la façon suivante :

$$\lambda = \sqrt{\frac{D_{\text{libre}}}{CDA}} \quad (\text{VI.1})$$

Où D_{libre} est le coefficient de diffusion d'une molécule en milieu libre, et CDA est le coefficient de diffusion apparent d'une molécule au sein de l'EEC. Une valeur de tortuosité élevée signifie que la diffusion est fortement entravée. Plusieurs techniques ont été proposées pour calculer ces coefficients, que nous présentons brièvement dans le paragraphe suivant.

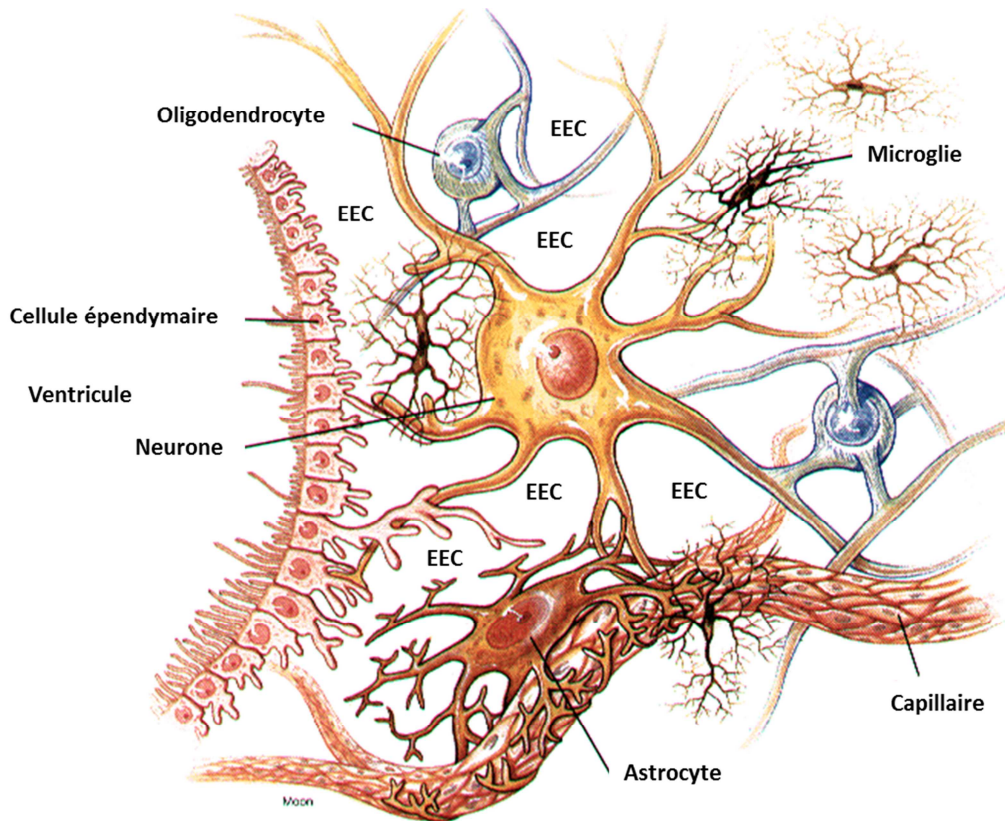


Figure VI-1 : Schéma de l'organisation cellulaire des tissus cérébraux (BrainCells n.d.). L'EEC représente l'espace entre les différentes cellules constituant le parenchyme cérébral.

VI-1.2. Méthodes de mesure du coefficient de diffusion apparent

VI-2.1.a) Utilisation de radiotraceurs

L'utilisation de radiotraceurs est la première technique ayant été proposée pour caractériser la diffusion de molécules dans l'EEC (Rall et al. 1962; Patlak & Fenstermacher 1975). Les molécules radiomarquées sont d'abord perfusées *in vivo* dans l'espace ventriculo-cisternal pendant un certain temps durant lequel elles vont pouvoir diffuser dans l'EEC. A l'issue de ce temps, le cerveau de l'animal est rapidement prélevé, et l'on mesure le profil de concentration du radiotracer induit par la diffusion depuis les parois ventriculaires. En répétant l'expérience pour différents temps de diffusion, on peut estimer le coefficient de diffusion apparent grâce à la solution de l'équation de la diffusion unidimensionnelle. Néanmoins, cette méthode nécessite le sacrifice d'un animal par point temporel, ce qui la rend peu éthique et coûteuse.

VI-2.1.b) Iontophorèse en temps réel

Cette technique a été introduite à la fin des années 1970 avec la miniaturisation des dispositifs de mesure. Il s'agit d'injecter des ions par iontophorèse dans une zone très localisée des tissus cérébraux grâce à une micro-pipette, ce qui permet d'utiliser l'hypothèse d'une source ponctuelle. Une micro-électrode placée à une distance connue du site d'injection va alors enregistrer les variations de concentration de l'ion au cours du temps, ce qui permet ensuite de calculer un coefficient de diffusion apparent à partir d'une solution de l'équation de diffusion. Cette technique est aujourd'hui la plus utilisée, avec comme sonde l'ion tetramethylammonium (TMA⁺) (Nicholson et al. 1979). Elle présente deux limitations principales :

- Les mesures n'étant réalisées qu'en un point, il est difficile de déterminer précisément le profil spatial de diffusion.
- Seuls quelques ions de petite taille (< 100 Da) peuvent être utilisés, ce qui limite l'étude de la diffusion de potentiels agents thérapeutiques dont le poids moléculaire peut atteindre plusieurs kDa.

VI-2.1.c) Imagerie optique intégrative

Cette technique, proposée dans les années 90, permet d'étudier la diffusion de macromolécules marquées par un fluorophore (Nicholson & Tao 1993). Ces molécules sont injectées dans les tissus cérébraux grâce à une micro-pipette, puis leur diffusion est suivie en réalisant des images de fluorescence des tissus. Par rapport à l'iontophorèse, cette méthode permet de suivre la diffusion d'agents de taille plus importante (quelques dizaines de kDa), et la diffusion de ces sondes est suivie en deux dimensions ce qui permet une estimation plus précise du CDA. Néanmoins, en raison de la faible profondeur de pénétration des rayons optiques aux longueurs d'ondes utilisées, l'utilisation de cette méthode est limitée à l'étude de tissus superficiels (corticaux essentiellement).

VI-2.1.d) Mesures par IRM

Par rapport aux techniques présentées précédemment, l'IRM présente l'avantage d'être non-invasif et de pouvoir imager des tissus profonds. En outre, les progrès techniques ont permis d'atteindre aujourd'hui de très bonnes résolutions spatiales et temporelles, notamment avec l'augmentation des champs magnétiques.

Une technique utilisant des agents de contraste a été introduite par (Marty et al. 2013). Il s'agit dans un premier temps d'injecter un agent de contraste IRM dans les tissus cérébraux à l'aide d'une seringue Hamilton, puis de suivre sa diffusion à l'aide de séquences d'imagerie IRM quantitatives. Le travail effectué sur les séquences IRM permet d'obtenir des cartes de concentration en agents de contraste précises avec une bonne résolution spatiale et dans des temps compatibles avec les temps de diffusion rapportés pour les techniques généralement utilisées. Cette méthode présente l'avantage d'être *in vivo*, de pouvoir étudier des tissus profonds et enfin de donner accès au comportement de molécules de tailles variées (diamètres hydrodynamiques de 1 à 20 nm). Il existe cependant une limite de taille (≈ 100 nm) au-delà de laquelle les temps de diffusion des molécules deviennent trop longs pour que cette technique puisse être utilisée (ceci nécessiterait des temps d'imagerie importants, non compatibles avec des expériences *in vivo*). D'autre part, les valeurs de tortuosité calculées avec cette approche étaient plus élevées que les valeurs obtenues par d'autres

techniques. L'hypothèse avancée est que l'utilisation d'une seringue Hamilton peut provoquer des dommages tissulaires tels que des oedèmes, susceptibles de modifier les propriétés de diffusion des tissus cérébraux (Marty 2012).. D'autre part, l'injection étant effectuée hors de l'IRM elle ne permet pas de suivre la diffusion aux temps courts.

VI-1.3. Motivations

L'objectif de ces travaux était de compléter l'étude de Marty et al., en répondant à la principale limitation présentée par cette approche, à savoir l'injection. Afin d'éviter la formation d'oedèmes et de garantir l'intégrité des tissus cérébraux, nous proposons de délivrer les agents de contraste par perméabilisation de la BHE. L'ensemble de la procédure étant effectué sous IRM, elle permet également de suivre la diffusion aux temps courts. L'ensemble de l'étude a été réalisé en collaboration avec Allegra Conti.

VI-2. Mesures de relaxivité des agents de contraste

VI-2.1. Les agents de contraste utilisés

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés à quatre agents paramagnétiques afin de pouvoir comparer leurs propriétés de diffusion. Trois d'entre eux sont des chélates de Gd commerciaux : Dotarem® (Guerbet, France), Gadovist® (Bayer, Allemagne) et MultiHance® (Bracco, Italie). Le quatrième appartient à une nouvelle classe d'agents paramagnétiques développés à l'Institut Lumière Matière de l'université Lyon 1, nommés AGuiX® (NanoH, France). Cet agent est constitué d'un cœur de polysiloxane sur lequel sont greffés des chélates de Gd. Il présente l'avantage d'offrir une très bonne biocompatibilité, une relaxivité importante (environ deux fois la relaxivité du Dotarem®) ce qui augmente la sensibilité de détection des mesures IRM, et enfin il peut être facilement fonctionnalisé.

Afin de mieux caractériser ces agents, leur taille a été mesurée par DLS (Diffusion Light Scattering) à la faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry. Les résultats sont résumés dans le tableau VI-1. D'autre part, afin de pouvoir mesurer leur concentration grâce aux images IRM, il est nécessaire de connaître leur relaxivité longitudinale r_1 . Nous avons donc mis en œuvre un protocole afin de la mesurer.

VI-2.2. Protocole expérimental

Comme nous l'avons vu dans le chapitre introductif, la relaxivité permet de relier linéairement la concentration à la baisse des temps de relaxation de l'eau environnant l'agent de contraste. Dans le cadre de cette étude, seuls des agents paramagnétiques ont été utilisés, nous avons donc mesuré uniquement la relaxation longitudinale r_1 .

Cette valeur varie à la fois avec le champ magnétique et la température. Il est donc important de la mesurer dans des conditions similaires à celles rencontrées *in vivo* (37 °C à 7 T).

Nous avons dans un premier temps réalisé pour chaque agent de contraste des galeries de tubes de différentes concentrations, dans un gel d'agarose 0,3 % en masse (concentration en agarose choisie pour les mesures de diffusion libre présentées au paragraphe suivant). Préalablement à la mesure, ces galeries sont portées à 37 °C.

Des cartes T_1 de ces tubes sont ensuite acquises à l'aide d'une séquence IR-FGE inspirée de la séquence (IV-4). Seuls les paramètres suivants ont été modifiés : 90 temps d'inversion (de 75 ms à 8975 ms, matrice = 120 x 120 x 5, résolution = 0,250 x 0,250 x 1,25 mm³, TR_1 = 15000 ms, 6 moyennes.

Durant l'acquisition, l'échantillon est maintenu à 37 °C grâce à une sonde de température et un système d'air chaud soufflé.

Les cartes de T_1 sont ensuite reconstruites, puis la valeur moyenne du temps de relaxation longitudinal dans chaque tube est calculée. On trace alors R_1 (l'inverse de T_1) en fonction de la concentration en Gd dans chaque tube. Le coefficient directeur de la droite obtenue représente la relaxivité r_1 (figure VI-2.B).

La figure VI-2 présente une carte T_1 d'une galerie de tubes, et la droite correspondante. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le tableau VI-1.

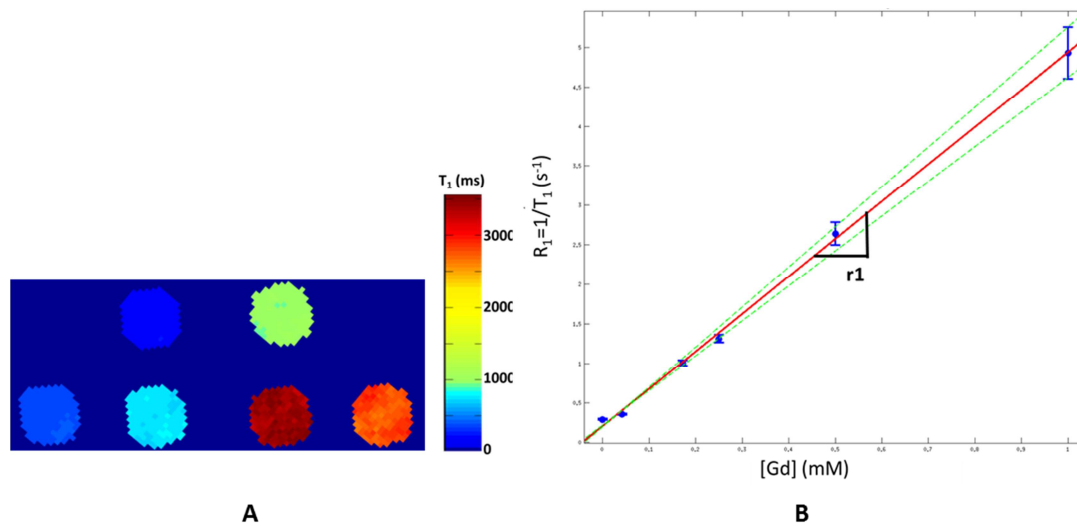


Figure VI-2 : Mesures de relaxivité : exemple du Dotarem. A. Carte T_1 obtenue pour une galerie de 6 tubes contenant différentes concentrations en Gd. B. R_1 (inverse de T_1) en fonction de la concentration. Le coefficient directeur de la droite ajustée sur les points de mesure (rouge) donne la relaxivité longitudinale r_1 .

VI-3. Mesure du coefficient de diffusion libre

VI-3.1. Protocole expérimental

Afin de mesurer le coefficient de diffusion en milieu libre, nous avons préparé *in vitro* un gel d'agarose à 0,3 % en masse, considéré comme non tortueux (Thorne & Nicholson 2006).

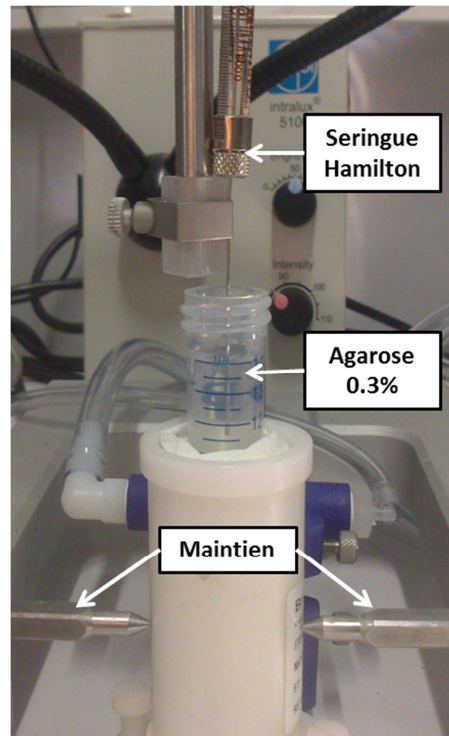


Figure VI-3 : Dispositif utilisé pour la mesure du coefficient de diffusion libre des agents de contraste. Le tube de gel est maintenu grâce à un cadre de stéréotaxie. La seringue Hamilton permet de réaliser une injection parfaitement verticale.

Pour chaque agent de contraste, 10 μL de solution à 5 mM en Gd sont injectés au centre du gel grâce à une seringue Hamilton (figure VI-3). Le tube de gel est maintenu dans un cadre stéréotaxique pour que l'injection soit parfaitement verticale. Ainsi, le cylindre formé par la seringue est parallèle à l'axe du tube, ce qui permet de conserver une symétrie cylindrique nécessaire au traitement des données (cf paragraphe suivant). La seringue est retirée lentement du tube durant l'injection, afin que la quantité d'agents de contraste déposée soit la plus homogène possible dans le cylindre formé par le passage de la seringue.

Suite à cette injection, la diffusion du composé est suivie durant environ une heure par IRM en acquérant des cartes T_1 à l'aide de la séquence IR-FGE présentée au chapitre IV (séquence IV-4). Durant les acquisitions, l'échantillon est maintenu à 37 °C de la même façon que pour les mesures de relaxivité.

VI-3.2. Calcul du coefficient de diffusion

La méthode d'injection utilisée crée une cheminée dans le gel d'agarose remplie de solution d'agent de contraste, ce qui permet de faire l'hypothèse d'une symétrie cylindrique (Marty et al. 2013). En supposant que la concentration est constante le long de la cheminée formée, on peut alors ramener le problème à une diffusion en 2 dimensions dans un plan perpendiculaire au tube. Par ailleurs, l'ensemble de l'agent de contraste étant déposé au temps $t = 0$, le problème posé ne comprend pas de terme source.

La solution d'une telle équation prédit que la concentration en agent de contraste suit à chaque temps t une distribution gaussienne donnée par l'équation suivante :

$$C(x,y) = C_0 \exp(-[a(x - x_0)^2 + b(x - x_0)(y - y_0) + c(y - y_0)^2]) \quad (\text{VI.2})$$

Avec C_0 la concentration initiale de la solution d'agent de contraste au site d'injection et (x_0, y_0) les coordonnées du site d'injection correspondant au centre de la gaussienne. Les coefficients a , b et c sont fonction de l'angle θ formé entre les axes principaux de la distribution gaussienne (X , Y) et les axes du repère de l'IRM, et des écarts type σ_x et σ_y le long de ces axes propres selon les équations :

$$a = \frac{\cos^2\theta}{2\sigma_x^2} + \frac{\sin^2\theta}{2\sigma_y^2} \quad b = -\frac{\sin 2\theta}{2\sigma_x^2} + \frac{\sin 2\theta}{2\sigma_y^2} \quad c = \frac{\sin^2\theta}{2\sigma_x^2} + \frac{\cos^2\theta}{2\sigma_y^2} \quad (\text{VI.3})$$

D'après la solution de l'équation de la diffusion en 2D, σ_x et σ_y sont fonction du temps t considéré, et des coefficients de diffusion D_x et D_y selon les axes propres de la gaussienne. On peut alors calculer ces coefficients de diffusion selon l'équation :

$$D_x = \frac{\sigma_x^2}{2t} \text{ et } D_y = \frac{\sigma_y^2}{2t} \quad (\text{VI.4})$$

En pratique, σ_x et σ_y sont calculés sur des cartes de concentrations acquises à différents temps de diffusion, puis D_x et D_y sont obtenus comme les coefficients directeurs de la droite σ_i^2 en fonction du temps (figure VI-4).

Le coefficient de diffusion libre D_{libre} est alors calculé comme la moyenne de D_x et D_y .

VI-3.3. Résultats

La figure VI-4 représente les cartes de concentration en Dotarem à différents temps d'acquisition, ainsi que les résultats de l'ajustement de la gaussienne correspondante. La courbe VI-4.D représente l'évolution des écarts type en fonction du temps de diffusion. On peut déjà noter que la relation est bien linéaire. D'autre part, pour chaque agent, nous avons observé une diffusion isotrope ($D_x \approx D_y$) ce qui confirme l'homogénéité du milieu. Les résultats pour chaque agent de contraste sont résumés dans le tableau VI-1. On observe que les valeurs de D_{libre} sont cohérentes avec les tailles mesurées par DLS, puisque les molécules de diamètre hydrodynamique le plus important diffusent moins vite.

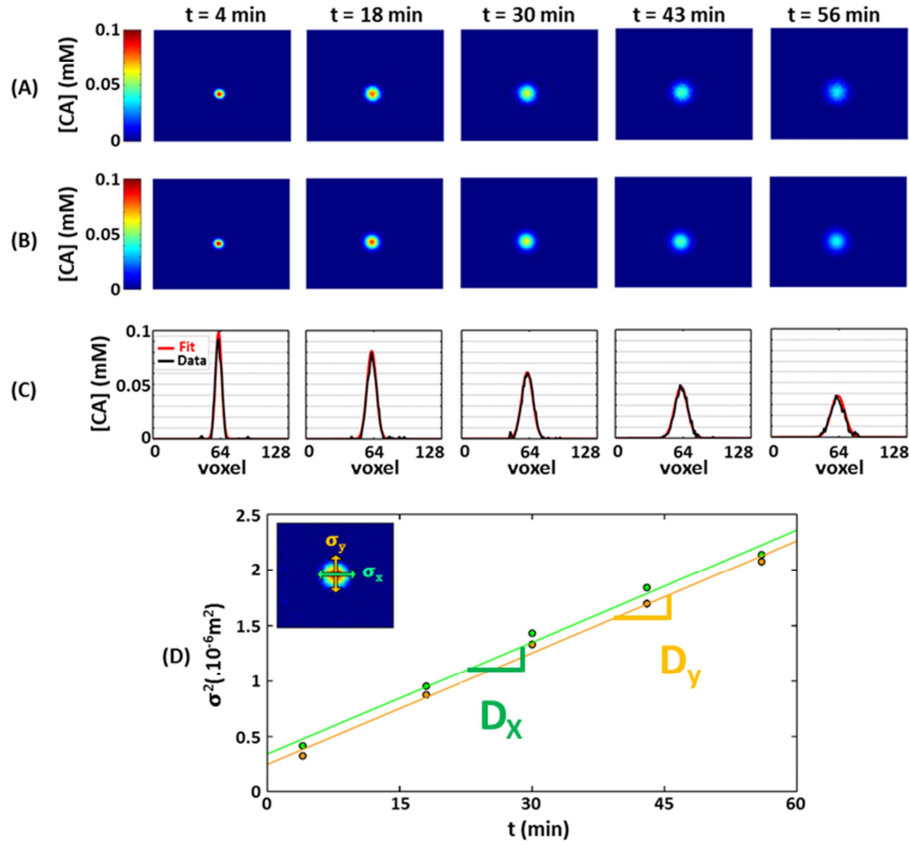


Figure VI-4 : Mesure de D_{libre} . A. Cartes de concentration obtenues à différents temps après injection. B. Ajustements gaussiens correspondants. C. Profils de concentration le long de la ligne centrale pour les images A et B, en noir les points expérimentaux et en rouge l'ajustement gaussien résultant. D. Les écarts type en fonction du temps de diffusion pour les deux axes propres de la gaussienne. Le coefficient directeur de ces droites est le coefficient de diffusion le long des axes propres.

VI-3.4. Mesure des diamètres hydrodynamiques

La relation de Stokes-Einstein permet de calculer le coefficient de diffusion de particules sphériques dans un milieu libre en fonction de leur taille selon l'équation :

$$D_{\text{libre}} = \frac{kT}{3\pi\eta d_{\text{HStokes}}} \quad (\text{VI.5})$$

k étant la constante de Boltzmann, T la température (en Kelvin), η la viscosité du milieu assimilé à de l'eau pure à 37 °C ($\eta = 6,92 \times 10^{-4}$ Pa.s) (Thorne et al. 2004) et d_{HStokes} le diamètre hydrodynamique. Ainsi, cette relation permet d'estimer le diamètre hydrodynamique des agents de contraste à partir de la mesure de D_{libre} . Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau VI-1. On peut noter que les valeurs obtenues par cette méthode sont semblables à celles obtenues par DLS, considéré comme la méthode de référence. Ceci valide donc nos hypothèses, et introduit une technique différente permettant d'estimer les diamètres hydrodynamiques.

VI-4. Mesures du coefficient de diffusion apparent

VI-4.1. Protocole expérimental

Pour ce protocole, 11 rats ont été utilisés (N = 3 par composé, N = 2 pour l'AGuiX®, 120-150 g).

La BHE a été perméabilisée selon le protocole décrit au paragraphe IV-1.2, en utilisant une pression acoustique de 0,8 MPa en ciblant le striatum gauche. Chacun des agents de contraste est injecté via bolus (0,5 M en Gd, 1,6 mL.kg⁻¹, 2 s). Dans ce cas, seule une séquence pondérée T₁ (séquence IV-2, avec seulement 3 moyennes) est acquise suite à l'injection de l'agent de contraste pour confirmer la perméabilisation. La perméabilisation est ensuite suivie durant une heure par l'acquisition de cartes T₁ avec la séquence IR-FGE (IV-4).

Après avoir reconstruit les cartes de concentration en Gd dans le cerveau à partir des cartes paramétriques de T₁, le CDA est calculé en ajustant une courbe gaussienne 2D sur les cartes de concentration de la même façon que pour le coefficient de diffusion libre. L'ajustement est réalisé sur la coupe correspondant au centre de la tache focale, et les images sont masquées de façon à ne considérer pour l'ajustement que les voxels pour lesquels la BHE a été perméabilisée (figure VI-5.B).

VI-4.2. Résultats

| Agent de contraste | # Rats | r1 @7T (mM ⁻¹ .s ⁻¹) | D _{libre} (10 ⁻¹¹ m ² .s ⁻¹) | CDA (10 ⁻¹¹ m ² .s ⁻¹) | d _{HStokes} (nm) | d _H DLS (nm) | λ |
|--------------------|--------|---|---|--|---------------------------|-------------------------|-----|
| Dotarem | 3 | 4,7 | 45 | 16 | 1,5 | 1,6 | 1,7 |
| Gadovist | 3 | 5,5 | 39 | 15 | 1,7 | 1,8 | 1,6 |
| MultiHance | 3 | 6,9 | 28 | 11 | 2,3 | 2,3 | 1,6 |
| AGuiX FR17 | 2 | 8,0 | 11 | 6 | 5,8 | 3,5 | 1,5 |

Tableau VI-1 : Résumé des différentes caractéristiques mesurées pour les différents agents de contraste.

La figure VI-5 présente les cartes de concentration obtenues lors du suivi de la diffusion du Dotarem® suite à la perméabilisation de la BHE. Les CDA obtenus pour chaque agent grâce à l'ajustement gaussien des cartes de concentration sont résumés dans le tableau VI-1.

Dans un premier temps, on peut noter que les CDA sont, pour chaque agent considéré, de deux à cinq fois plus faibles que D_{libre}. Ceci confirme que la diffusion est fortement ralentie au sein des tissus cérébraux par rapport à un milieu libre. Par ailleurs, comme pour la diffusion libre, on retrouve une corrélation entre le CDA et le diamètre hydrodynamique : les molécules les plus volumineuses diffusent moins vite.

D'autre part, ces valeurs de CDA et la connaissance de D_{libre} nous ont permis de calculer la tortuosité des tissus cérébraux à partir de l'équation (VI.1). Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau VI-1.

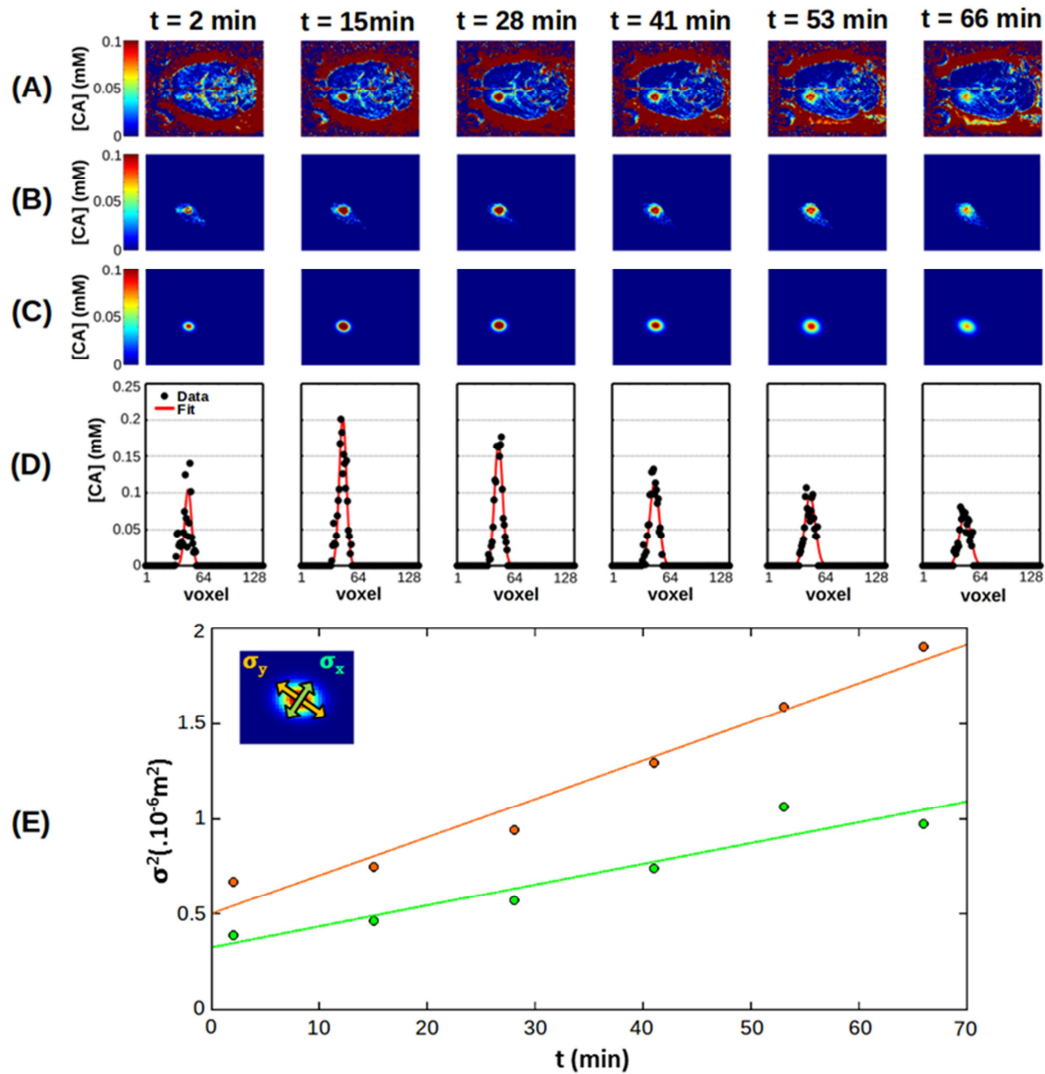


Figure VI-5 : Diffusion de Dotarem® suite à une perméabilisation de la BHE. A. Cartes de concentration à différents temps après injection de Dotarem®. B. Masque utilisé pour l'ajustement gaussien. C. Ajustements gaussiens de (B). D. Profils le long de la ligne passant par le point d'intensité maximum pour chacune des images de B (points noirs) et de C (ligne rouge). E. Pour chaque temps, un ajustement gaussien est réalisé sur les cartes de concentration. Les $\sigma^2_{x,y}$ sont ensuite tracés en fonction du temps de diffusion. Le coefficient directeur des droites obtenues représente le coefficient de diffusion selon les axes propres de la gaussienne.

Nous pouvons déjà noter que, comme attendu pour des composés de tailles similaires, les valeurs de tortuosité obtenues sont semblables quel que soit l'agent considéré ce qui valide l'hypothèse de diffusion passive. D'autre part, elles sont en accord avec les données de la littérature, évaluées avec des techniques différentes (Nicholson & Tao 1993; Thorne & Nicholson 2006). Ceci confirme donc l'intérêt de cette méthode par rapport à une injection directe, pour laquelle les valeurs de tortuosité étaient légèrement surestimées (Marty et al. 2013). L'hypothèse avancée pour expliquer cette différence était la formation d'œdème suite à l'introduction de la seringue, modifiant l'EEC et donc ses propriétés de diffusion (Binder 2004), un phénomène que permet d'éviter la perméabilisation de la BHE par ultrasons.

Par ailleurs, des études ont montré que la tortuosité pouvait représenter un indicateur de certaines conditions pathologiques telles que l'ischémie ou l'anoxie (Syková & Nicholson 2008). Cette nouvelle approche n'induisant pas de dommages et ne modifiant pas les propriétés de diffusion de

l'EEC, elle pourrait être envisagée comme outil de suivi longitudinal de ces pathologies. Nous avons également vu que par rapport à une injection intracérébrale, les valeurs de tortuosité obtenues après une perméabilisation de la BHE étaient plus faibles. Ceci signifie que le CDA est plus important, donc la diffusion meilleure, des agents thérapeutiques délivrés avec cette méthode atteindront donc plus rapidement leur cible.

Enfin, l'IRM permettant d'observer l'intégralité du parenchyme cérébral de façon non-invasive, et les ultrasons pouvant être focalisés dans chaque région du cerveau, cette méthode peut théoriquement permettre de mesurer les propriétés de diffusion de toutes les régions cérébrales.

VI-5. Perspectives

VI-5.1. Diminution du temps d'acquisition des cartes paramétriques T_1

La réduction du temps nécessaire à l'acquisition des cartes paramétriques T_1 pourrait avoir deux points d'intérêt particuliers :

- Obtenir un meilleur échantillonnage temporel du suivi de la diffusion à résolution spatiale constante
- Améliorer la résolution spatiale en conservant le même temps d'acquisition, afin de répondre par exemple à la problématique présentée au paragraphe précédent.

Une étude récente a proposé une méthode permettant d'accélérer l'acquisition de cartes paramétriques T_1 en s'inspirant de la méthode Look-Locker (Castets et al. 2015). Dans ce travail, contrairement à une séquence Look-Locker classique telle que nous l'avons présentée au chapitre I, le délai permettant la repousse de l'aimantation longitudinale à la fin d'une répétition est supprimé. Dans ce cas, l'équation (I.11) ne permet plus de décrire la repousse de M_z . Les auteurs proposent donc une nouvelle équation pour décrire l'évolution de M_z prenant en compte cette repousse incomplète. La valeur du signal S_i à l'issue du i -ème pulse α est alors donnée par:

$$S_i = A \left(m_\infty - (m_{\max} + m_\infty) \left[\cos(\alpha) \exp\left(-\frac{T_{R2}}{T_1}\right) \right]^i \right) \quad (\text{VI.6})$$

Avec :

$$m_\infty = \frac{1 - \exp\left(-\frac{T_{R2}}{T_1}\right)}{1 - \cos(\alpha) \exp\left(-\frac{T_{R2}}{T_1}\right)} \quad (\text{VI.7})$$

A représente un coefficient de proportionnalité, et m_{\max} est une constante inférieure à 1. Du fait de la suppression du délai entre la fin d'une acquisition et l'inversion suivante, le système de spins entre dans un état stationnaire, ce qui induit une aimantation stationnaire apparente plus faible que dans le cas de la méthode Look-Locker classique. Cette diminution est représentée par la constante m_{\max} , qui décrit l'aimantation maximum (c'est à dire l'aimantation avant une nouvelle inversion) atteinte avec cette nouvelle méthode.

L'équation (VI.7) telle qu'elle est donnée décrit le cas où un T_1 correspond à l'application d'un pulse α , c'est-à-dire le cas où à l'issue d'une inversion l'on ne reconstruit la courbe de repousse de

l'aimantation que pour un pas de phase. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe I-5.4, nous avons choisi de segmenter les acquisitions afin d'accélérer la séquence. Dans ce cas, N lignes de l'espace K sont acquises à chaque TI. En notant maintenant S_i le signal recueilli à l'issue du i-ème TI, il est alors donné par la nouvelle équation :

$$S_i = A \left(m_{\infty} - (m_{max} + m_{\infty}) \left[\cos^N(\alpha) \exp\left(-\frac{NT_{R2}}{T_1}\right) \right]^i \right) \quad (VI.8)$$

(VI.8) représente la nouvelle équation à ajuster pour notre schéma d'acquisition, les paramètres de cet ajustement étant A, m_{max} et T_1 .

Pour vérifier la validité de cette nouvelle méthode avec notre séquence de cartographie T_1 , nous avons réalisé des acquisitions d'une galerie de tubes de T_1 connus à l'aide de la séquence IR-FGE (séquence IV-4), pour des TR_1 raccourcis à 6500 ms (soit 1600 ms entre la fin d'une acquisition et l'inversion suivante) et 4900 ms (soit 50 ms entre la fin d'une acquisition et l'inversion suivante). Ces premiers essais n'ont pour le moment pas été complètement satisfaisants (valeurs de T_1 erronées). Néanmoins, ce travail ayant effectué à la fin de ma thèse, nous n'avons pas eu le temps de le terminer, il sera donc continué au sein de l'équipe puisqu'il représente une perspective très intéressante. En diminuant le TR de 9000 ms à 4900 ms, le temps d'acquisition sera quasiment divisé par deux.

VI-5.2. Perméabilisation de la BHT

Les expériences présentées dans ce chapitre ont été effectuées sur des animaux sains, et nous avons montré que notre approche n'engendrait pas de modification des propriétés de diffusion des tissus. Comme nous l'avons rappelé, la connaissance de ces propriétés est intéressante lorsque l'on cherche à délivrer des agents thérapeutiques, notamment dans les tumeurs, puisqu'elles vont gouverner sa biodistribution. A ce titre, nous avons effectué des expériences préliminaires visant à perméabiliser la BHT, en vue d'expériences futures de diffusion d'agent de contraste dans les tumeurs. Nous avons vu dans le chapitre introductif que la BHT était altérée par rapport à une BHE normale, ce qui signifie qu'à l'état basal des molécules peuvent déjà partiellement la franchir. Nous avons donc décidé d'implanter deux tumeurs de manière symétrique afin de comparer la délivrance d'agent de contraste dans les tumeurs avec et sans perméabilisation de la BHT. Les expériences ont été réalisées avec l'aide de Matthieu Gerstenmayer, et les implantations ont été effectuées par Françoise Geffroy.

VI-2.5.a) Protocole expérimental

8 rats (150 g) ont subi l'implantation de deux tumeurs à 3 mm à gauche et 3 mm à droite du Bregma et à 4 mm de profondeur, une tumeur servant pour le test de perméabilisation de la BHT et l'autre en tant que contrôle. Le protocole et le modèle utilisés sont identiques à ceux présentés au paragraphe V-2.2. La croissance des tumeurs a été suivie longitudinalement sur des images pondérées T_2 (cf paragraphe V-2.2) dans le but de perméabiliser la BHT dans une tumeur de 3-4 mm de diamètre, ce qui correspond à 10 jours après l'induction. Sur les 8 rats induits, seuls 5 ont survécu.

La BHT a ensuite été perméabilisée dans l'une des tumeurs seulement selon le protocole présenté au paragraphe IV-1.2. Dans ce cas, elle a été mise en évidence par l'injection d'AGuIX fonctionnalisé avec du polyéthylène glycol (PEG) (0,5 M, 1,6 mL/kg, 2 s). Durant les expériences, deux

rats sont décédés à la suite de l'injection de l'agent de contraste (nous avons mis en cause à la fois la faiblesse des animaux, mais également la viscosité importante de la solution injectée), et l'un des trois rats restants a été sacrifié en raison de tumeurs de taille trop importante.

VI-2.5.b) Résultats

La figure VI-6 montre les cartes de concentration en AGuIX obtenues à différents temps après son injection. Dans un premier temps, pour l'image obtenue à $t = 5$ minutes, on peut noter que la pénétration de l'agent de contraste est naturellement plus importante dans les tumeurs que dans le cerveau, même dans celle n'ayant pas été perméabilisée, ce qui illustre la perméabilité accrue de la BHT. On n'observe néanmoins pas de différence significative de concentration entre les deux tumeurs. A partir de $t = 18$ minutes et jusqu'à la fin des acquisitions, on peut noter que la concentration en agent de contraste devient plus importante dans la tumeur ayant été perméabilisée. En calculant la concentration moyenne sur chacune des deux tumeurs, nous avons trouvé une concentration environ 1,5 fois plus importante dans la tumeur ayant été soumise aux ultrasons.

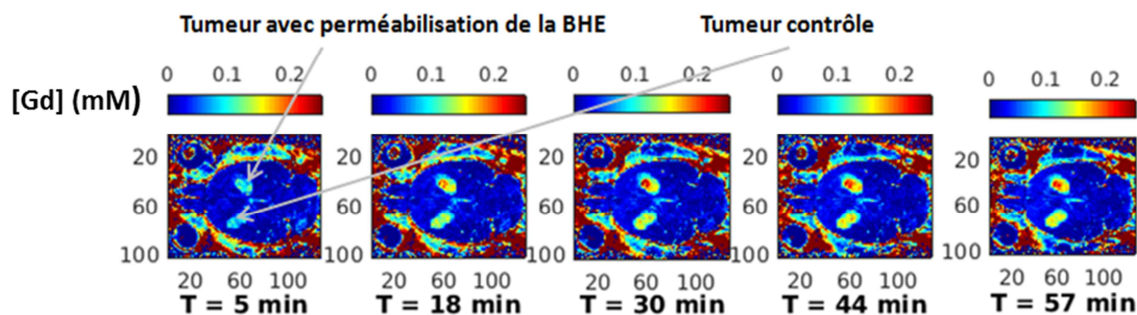


Figure VI-6 : Cartes de concentration en AGuIX à différents temps après perméabilisation de la BHT dans l'une des tumeurs.

Ces expériences étant très préliminaires, nous n'avons pas encore effectué de calculs de diffusion sur ces données. Nous avons néanmoins montré quantitativement que les ultrasons permettaient d'augmenter la dose d'agent de contraste délivrée dans une tumeur. Cette première expérience confirme de plus l'intérêt du système motorisé que nous avons développé, puisqu'il permet de cibler sélectivement l'une des tumeurs, l'autre étant utilisée en tant que contrôle.

VI-6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une nouvelle approche inspirée des travaux de Benjamin Marty permettant la mesure des propriétés de diffusion des tissus cérébraux. Nous avons en particulier montré que remplacer l'injection intracérébrale par une perméabilisation de la BHE par ultrasons permettait des mesures précises des coefficients de diffusion apparents dans le cerveau, sans modifier les propriétés des tissus. Ces mesures ont été validées par une comparaison des tortuosités calculées avec les valeurs disponibles dans la littérature. En outre, grâce à l'utilisation conjointe de l'IRM et des ultrasons, cette technique permet d'obtenir des mesures en tout point du cerveau, de façon non invasive et non destructrice pour les tissus.

Conclusion générale et perspectives

Dans ce travail de thèse, nous avons pu développer de nouveaux outils permettant le guidage et l'étude par IRM à haut champ magnétique de la perméabilisation de la BHE par ultrasons. Ces développements ont ensuite pu être utilisés dans le cadre de différentes applications visant à mettre en évidence certains effets des ultrasons sur les tissus cérébraux.

Dans un premier temps, nous avons développé et validé un système motorisé compatible IRM permettant de déplacer le transducteur à l'intérieur d'un scanner préclinique de 90 mm de diamètre. Ce travail a nécessité le développement de solutions spécifiques aux contraintes imposées par l'espace restreint d'un tel scanner, afin de pouvoir intégrer tous les éléments nécessaires à une expérience de perméabilisation de la BHE guidée par IRM, en particulier un système de maintien stéréotaxique et une antenne dédiée. Nous avons pu montrer que ce système permettait à la fois de cibler des zones anatomiques à traiter de façon reproductible, mais également de délivrer des molécules injectées par voie intraveineuse sur des régions étendues du cerveau selon des trajectoires arbitraires. Ce travail a été complété par des développements logiciel de transmission des images IRM en temps réel, et de détection automatique de la tache focale sur les images ARFI. L'ensemble de cette chaîne de traitement offre un gain de temps et de reproductibilité. Ces avantages devraient bénéficier à la fois aux études fondamentales des mécanismes régissant la perméabilisation de la BHE, mais également à des travaux plus applicatifs visant à tester de nouvelles molécules thérapeutiques pour des pathologies cérébrales. D'autre part, nous avons cherché à développer un système qui soit modulable et puisse être utilisé pour d'autres applications des ultrasons sous IRM. Cette capacité a été illustrée par une preuve de concept de neurostimulation par ultrasons sous IRM couplée à des séquences d'imagerie fonctionnelle.

Une partie des travaux présentés a également été destinée à l'étude des effets biologiques induits par une perméabilisation de la BHE par ultrasons. Dans un premier temps, nous avons cherché à étudier l'effet de différents paramètres acoustiques sur l'efficacité d'une perméabilisation de la BHE selon des trajectoires arbitraires, afin d'optimiser le protocole en vue de délivrer des molécules sur des régions étendues du cerveau. Nous avons montré que le système développé permettait de perméabiliser la BHE sur un hémisphère ou sur le cerveau entier. Nous avons également réalisé une étude immunohistochimique des effets induits par les ultrasons de 0 à 15 jours après la perméabilisation et pour différentes pressions acoustiques. Nous avons pu montrer que le protocole induisait une activation des cellules gliales qui persistait jusqu'à au moins 15 jours après application des ultrasons. Même si les conséquences exactes de ce résultat n'ont pas été prouvées avec certitude, il montre l'importance d'études à plus long terme, surtout dans un contexte où des sessions répétées d'ouverture de la BHE seront envisagées. Enfin, nous avons également cherché pour la première fois à démontrer le passage de marqueurs tumoraux du cerveau vers le sang suite à une perméabilisation de la BHE. Lors de cette étude, nous avons pu montrer que l'application des ultrasons n'induisait pas de modification du profil protéomique des tissus cérébraux sains. Les premiers résultats de l'analyse des sérums semble montrer que leur composition change environ 24h après le protocole. Afin de compléter ces premiers résultats, des expériences complémentaires plus précises sont d'ores et déjà planifiées.

Enfin, nous avons pu utiliser le système développé pour réaliser une étude de la diffusion de différents agents de contraste dans les tissus cérébraux suite à une perméabilisation de la BHE. Nous

avons pu comparer ces résultats aux mesures de coefficient de diffusion libre de ces mêmes agents afin de calculer la tortuosité des tissus cérébraux, et nous avons montré que les valeurs obtenues étaient semblables à celles de la littérature. Ainsi, cette nouvelle méthodologie permet d'obtenir une caractérisation précise des propriétés de diffusion de différentes molécules *in vivo*, de façon non-invasive et dans toutes les régions du cerveau. Elle pourrait donc représenter un outil extrêmement utile au développement et à la caractérisation de nouveaux agents thérapeutiques pour les pathologies cérébrales.

Nous avons donc pu démontrer dans ce manuscrit les capacités du système développé. Nous avons néanmoins vu que certains points étaient encore perfectibles, et seront améliorés dans un travail futur, en particulier l'antenne RF. Dans le but de rendre le système plus modulable, un lit dédié à la souris est également en cours de test. Enfin, un transducteur multi-éléments dédié à la perméabilisation de la BHE et intégrant un détecteur de cavitation est actuellement en cours de design.

Concernant les applications du système, nous avons présenté dans ce manuscrit des études préliminaires portant principalement sur l'étude des mécanismes de perméabilisation de la BHE et sur l'amélioration de sa sécurité. Elles nous ont permis d'aboutir à des protocoles reproductibles et sans danger identifiés. Ces travaux ouvrent donc la voie à des études plus applicatives. L'équipe envisage en particulier de travailler sur des modèles rongeurs de la maladie d'Alzheimer afin de compléter les travaux de (Leinenga & Götz 2015). Des applications sur des modèles tumoraux sont également envisagées, notamment théranostiques avec les nanoparticules AGuiX présentées dans ce manuscrit. En effet, en plus d'être des agents de contraste, ces nanoparticules ont un effet radiosensibilisant. Le système présenté dans ce manuscrit permettrait donc de cibler la tumeur afin d'augmenter la dose d'agent délivrée, et de la radiosensibiliser. Enfin, des travaux supplémentaires seront menés sur les expériences de neuromodulation. En effet, être capable de choisir, grâce aux moteurs, une zone cérébrale à stimuler et pouvoir enregistrer la réponse neuronale par IRM fonctionnelle ouvre des perspectives très intéressantes dans la compréhension du fonctionnement du SNC.

Bibliographie

- Abbott, N.J., 2013. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of inherited metabolic disease*, 36(3), pp.437–49.
- Abbott, N.J. et al., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37(1), pp.13–25.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L. & Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1), pp.41–53.
- Aebischer, P. & Ridet, J., 2001. Recombinant proteins for neurodegenerative diseases: the delivery issue. *Trends in neurosciences*, 24(9), pp.533–40.
- Ai, Y. et al., 2003. Intraputamenal infusion of GDNF in aged rhesus monkeys: distribution and dopaminergic effects. *The Journal of comparative neurology*, 461(2), pp.250–61.
- Alonso, A. et al., 2010. neurons but not glial cells overexpress ubiquitin in the rat brain following focused ultrasound-induced opening of the blood-brain barrier. *NSC*, pp.1–9.
- Arvanitis, C.D. et al., 2012. Controlled ultrasound-induced blood-brain barrier disruption using passive acoustic emissions monitoring. *PloS one*, 7(9), p.e45783.
- Aryal, M. et al., 2013. Multiple treatments with liposomal doxorubicin and ultrasound-induced disruption of blood–tumor and blood–brain barriers improve outcomes in a rat glioma model. *Journal of Controlled Release*.
- Aryal, M. et al., 2014. Ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption for targeted drug delivery in the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews*, 0, pp.94–109.
- Assistance Publique Hopitaux de Paris, 2014. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02253212?term=sonocloud&rank=1>.
- Aubry, J. et al., 2013. The road to clinical use of high-intensity focused ultrasound for liver cancer: technical and clinical consensus. *Journal of therapeutic ultrasound*, 1(1), p.13.
- Bæk, D., Jensen, J.A. & Willatzen, M., 2010. Modeling transducer impulse responses for predicting calibrated pressure pulses with the ultrasound simulation program Field II. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 127(5), pp.2825–35.
- Bailey, M.R. et al., 2003. Physical mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound (a review). *Acoustical Physics*, 49(4), pp.369–388.
- Bakay, L. et al., 1956. Ultrasonically produced changes in the blood-brain barrier. *A.M.A. archives of neurology and psychiatry*, 76(5), pp.457–67.
- Ballantine, H.T., Bell, E. & Manlapaz, J., 1960. Progress and problems in the neurological applications of focused ultrasound. *Journal of neurosurgery*, 17, pp.858–76.

Bibliographie

- Bandopadhyay, R. et al., 2001. Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *Journal of neurocytology*, 30(1), pp.35–44.
- Barker, A.T., Jalinous, R. & Freeston, I.L., 1985. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet*, 1(8437), pp.1106–7.
- Barnard, J.W. et al., 1955. Effects of high intensity ultrasound on the central nervous system of the cat. *The Journal of comparative neurology*, 103(3), pp.459–84.
- Barth, R.F. & Kaur, B., 2009. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *Journal of neuro-oncology*, 94(3), pp.299–312.
- Basser, P.J., Mattiello, J. & Le Bihan, D., 1994. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical journal*, 66(1), pp.259–67.
- Bazzoni, G. & Dejana, E., 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*, 84(3), pp.869–901.
- Begley, D.J. & Brightman, M.W., 2003. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progrès des recherches pharmaceutiques*, 61, pp.39–78.
- Bellavance, M.-A., Blanchette, M. & Fortin, D., 2008. Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *The AAPS journal*, 10(1), pp.166–77.
- Benabid, A.L. et al., 1993. Chronic VIM thalamic stimulation in Parkinson's disease, essential tremor and extra-pyramidal dyskinesias. *Acta neurochirurgica. Supplementum*, 58, pp.39–44.
- Bercoff, J. et al., 2004. Monitoring Thermally-Induced Lesions with Supersonic Shear Imaging. *Ultrasonic Imaging*, 26(2), pp.71–84.
- Bernacki, J. et al., 2008. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacological reports : PR*, 60(5), pp.600–22.
- Biagi, B.A. & Enyeart, J.J., 1990. Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 259(3), pp.C515–520.
- Bihrlé, R. et al., 1994. High-intensity focused ultrasound in the treatment of prostatic tissue. *Urology*, 43(2 Suppl), pp.21–6.
- Binder, D.K., 2004. In Vivo Measurement of Brain Extracellular Space Diffusion by Cortical Surface Photobleaching. *Journal of Neuroscience*, 24(37), pp.8049–8056.
- Blana, A. et al., 2008. First analysis of the long-term results with transrectal HIFU in patients with localised prostate cancer. *European Urology*, 53(6), pp.1194–1203.
- Bloembergen, N., 1957. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 27(2), p.572.
- Bloembergen, N., Purcell, E. & Pound, R., 1948. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review*, 73(7), pp.679–712.

- BOTTOMLEY, P.A., 1987. Spatial Localization in NMR Spectroscopy in Vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 508(1 Physiological), pp.333–348.
- Bradbury, M. et al., 1963. The distribution of potassium, sodium, chloride and urea between lumbar cerebrospinal fluid and blood serum in human subjects. *Clinical Science*, 25, pp.97–105.
- BrainCells, <http://gabrielarogers.blogspot.fr/>.
- Bushberg, J. T., et al., 2002. *The Essential Physics of Medical Imaging*. 2nd ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Butt, A.M., Jones, H.C. & Abbott, N.J., 1990. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of physiology*, 429, pp.47–62.
- Candela, P. et al., 2010. Apical-to-basolateral transport of amyloid- β peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 22(3), pp.849–59.
- Castets, C.R. et al., 2015. Fast and robust 3D T1 mapping using spiral encoding and steady RF excitation at 7 T: application to cardiac manganese enhanced MRI (MEMRI) in mice. *NMR in biomedicine*, (1).
- Choi, J.J. et al., 2010. Molecules of various pharmacologically-relevant sizes can cross the ultrasound-induced blood-brain barrier opening in vivo. *Ultrasound in medicine & biology*, 36(1), pp.58–67.
- Choi, J.J., Selert, K., Gao, Z., et al., 2011. Noninvasive and localized blood-brain barrier disruption using focused ultrasound can be achieved at short pulse lengths and low pulse repetition frequencies. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(2), pp.725–37.
- Choi, J.J., Selert, K., Vlachos, F., et al., 2011. Noninvasive and localized neuronal delivery using short ultrasonic pulses and microbubbles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), pp.16539–44.
- Choi, J.J. et al., 2007. Noninvasive, transcranial and localized opening of the blood-brain barrier using focused ultrasound in mice. *Ultrasound in medicine & biology*, 33(1), pp.95–104.
- Chopra, R. et al., 2009. An MRI-compatible system for focused ultrasound experiments in small animal models. *Medical Physics*, 36(5), pp.1867–74.
- Chopra, R., Vykhodtseva, N. & Hynynen, K., 2010. Influence of exposure time and pressure amplitude on blood-brain-barrier opening using transcranial ultrasound exposures. *ACS chemical neuroscience*, 1(5), pp.391–398.
- Cloughesy, T.F. & Black, K.L., 1995. Pharmacological blood-brain barrier modification for selective drug delivery. *Journal of neuro-oncology*, 26(2), pp.125–32.
- Couture, O. et al., 2014. Review of ultrasound mediated drug delivery for cancer treatment : updates from pre-clinical studies. *Translational Cancer Research*, 3(5), pp.494–511.

Bibliographie

- Dayton, P. et al., 1999. Acoustic radiation force in vivo: a mechanism to assist targeting of microbubbles. *Ultrasound in medicine & biology*, 25(8), pp.1195–201.
- Deffieux, T. et al., 2013. Low-intensity focused ultrasound modulates monkey visuomotor behavior. *Current biology*, 23(23), pp.2430–2433.
- Deichmann, R. & Haase, A., 1992. Quantification of T1 Values by SNAPSHOT-FLASH NMR Imaging. *Journal of Magnetic resonance*, 96, pp.608–612.
- Deichmann, R., Hahn, D. & Haase, a, 1999. Fast T1 mapping on a whole-body scanner. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 42(1), pp.206–9.
- Dervishi, E. et al., 2013. Transcranial high intensity focused ultrasound therapy guided by 7 TESLA MRI in a rat brain tumour model: a feasibility study. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 29(6), pp.598–608.
- Doolittle, N.D. et al., 2000. Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer*, 88(3), pp.637–47.
- Dutheil, F. et al., 2010. ABC transporters and cytochromes P450 in the human central nervous system: influence on brain pharmacokinetics and contribution to neurodegenerative disorders. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 6(10), pp.1161–74.
- Elias, W.J. et al., 2013. A pilot study of focused ultrasound thalamotomy for essential tremor. *The New England journal of medicine*, 369(7), pp.640–8.
- Ferri, C. et al., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366(9503), pp.2112–2117.
- Fischer, H., Gottschlich, R. & Seelig, A., 1998. Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion. *The Journal of membrane biology*, 165(3), pp.201–211.
- Flynn, H.G., 1964. Physics of acoustic cavitation in liquids. In *Physical acoustics*.
- FRY, F.J., ADES, H.W. & FRY, W.J., 1958. Production of reversible changes in the central nervous system by ultrasound. *Science (New York, N.Y.)*, 127(3289), pp.83–4.
- Gabathuler, R., 2010. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of disease*, 37, pp.48–57.
- Gingrich, M.B. & Traynelis, S.F., 2000. Serine proteases and brain damage – is there a link? *Trends in Neurosciences*, 23(9), pp.399–407.
- Guillaume, D.J. et al., 2010. Intra-arterial chemotherapy with osmotic blood-brain barrier disruption for aggressive oligodendroglial tumors: results of a phase I study. *Neurosurgery*, 66(1), pp.48–58; discussion 58.

- Hanig, J.P., Morrison, J.M. & Krop, S., 1972. Ethanol enhancement of blood-brain barrier permeability to catecholamines in chicks. *European journal of pharmacology*, 18(1), pp.79–82.
- Hansen, a J., 1985. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiological reviews*, 65(1), pp.101–148.
- Hervé, F., Ghinea, N. & Scherrmann, J.-M., 2008. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *The AAPS journal*, 10(3), pp.455–72.
- Hindman, J.C., 1966. Proton Resonance Shift of Water in the Gas and Liquid States. *The Journal of Chemical Physics*, 44(12), p.4582.
- Hsieh, D.-Y. & Plesset, M.S., 1961. Theory of Rectified Diffusion of Mass into Gas Bubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 33(2), p.206.
- Hynynen, K. et al., 2004. 500-element ultrasound phased array system for noninvasive focal surgery of the brain: a preliminary rabbit study with ex vivo human skulls. *Magnetic resonance in medicine*, 52(1), pp.100–7.
- Hynynen, K. et al., 2005. Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications. *NeuroImage*, 24(1), pp.12–20.
- Hynynen, K. & McDannold, N., 2001. Noninvasive MR Imaging – guided Focal Opening of the Blood-Brain Barrier in Rabbits. *Radiology*, 220(4), pp.640–646.
- Insightec, 2015. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02343991?term=insightec&rank=11>.
- Ishihara, Y. et al., 1995. A precise and fast temperature mapping using water proton chemical shift. *Magnetic resonance in medicine*, 34(6), pp.814–23.
- Jensen, J.A. et al., 1996. Field : A Program for Simulating Ultrasound Systems. *Medical & biological engineering & computing*, 34, pp.351–353.
- Jordão, J.F. et al., 2013. Amyloid- β plaque reduction, endogenous antibody delivery and glial activation by brain-targeted, transcranial focused ultrasound. *Experimental neurology*, 248C, pp.16–29.
- Kacem, K. et al., 1998. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*, 23(1), pp.1–10.
- Kalvass, J.C. et al., 2013. Why clinical modulation of efflux transport at the human blood-brain barrier is unlikely: the ITC evidence-based position. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 94(1), pp.80–94.
- Karatas, H. et al., 2009. A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(44), pp.13761–9.
- King, R.L. et al., 2013. Effective Parameters for Ultrasound-Induced In Vivo Neurostimulation. *Ultrasound in medicine & biology*, 39(2), pp.312–331.

Bibliographie

- Krewson, C.E., Klarman, M.L. & Saltzman, W.M., 1995. Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium. *Brain research*, 680(1-2), pp.196–206.
- Kuo, P.H. et al., 2007. Gadolinium-based MR contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *Radiology*, 242(3), pp.647–9.
- Lam, M.K. et al., 2015. Quality of MR thermometry during palliative MR-guided high-intensity focused ultrasound (MR-HIFU) treatment of bone metastases. *Journal of therapeutic ultrasound*, 3(1), pp.1–15.
- Larrat, B., 2010. *Méthodes de quantification des déplacements en Imagerie par Résonance Magnétique et leurs applications pour la caractérisation mécanique de tissus mous et le guidage de la thérapie par ultrasons focalisés*. Thèse de doctorat, Université Paris VII, France.
- Larrat, B. et al., 2010. MR-guided adaptive focusing of ultrasound. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 57(8), pp.1734–7.
- Larrat, B. et al., 2010a. MR-guided transcranial brain HIFU in small animal models. *Physics in medicine and biology*, 55(2), pp.365–388.
- Larrat, B. et al., 2010b. MR-guided transcranial brain HIFU in small animal models. *Physics in medicine and biology*, 55(2), pp.365–88.
- Lee, H.J., Zhang, Y. & Pardridge, W.M., 2002. Blood-brain barrier disruption following the internal carotid arterial perfusion of alkyl glycerols. *Journal of drug targeting*, 10(6), pp.463–7.
- Lee, K.M. & MacLean, A.G., 2015. New advances on glial activation in health and disease. *World journal of virology*, 4(2), pp.42–55.
- Legon, W. et al., 2014. Transcranial focused ultrasound modulates the activity of primary somatosensory cortex in humans. *Nature neurosciences*, 17(2), pp.322–329.
- Leinenga, G. & Götz, J., 2015. Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, 7(278).
- Liberman, B. et al., 2009. Pain Palliation in Patients with Bone Metastases Using MR-Guided Focused Ultrasound Surgery: A Multicenter Study. *Annals of Surgical Oncology*, 16(1), pp.140–146.
- Liu, H.-L. et al., 2010. Blood-Brain Barrier Disruption with Focused Ultrasound Enhances Delivery of Chemotherapeutic Drugs for Glioblastoma Treatment. *Radiology*, 255(2).
- Liu, H.-L. et al., 2014. Combining microbubbles and ultrasound for drug delivery to brain tumors: current progress and overview. *Theranostics*, 4(4), pp.432–44.
- Liu, H.-L. et al., 2012. Enhanced therapeutic agent delivery through magnetic resonance imaging-monitored focused ultrasound blood-brain barrier disruption for brain tumor treatment: an overview of the current preclinical status. *Neurosurgical focus*, 32(January), pp.1–12.
- Liu, H.-L. et al., 2008. Hemorrhage detection during focused-ultrasound induced blood-brain-barrier opening by using susceptibility-weighted magnetic resonance imaging. *Ultrasound in medicine & biology*, 34(4), pp.598–606.

- Liu, X. et al., 2004. Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 32(1), pp.132–9.
- Look, D.C. & Locker, D.R., 1968. Nuclear Spin-Lattice Relaxation Measurements by Tone-Burst Modulation. *Physical Review Letters*, 20(18), pp.987–989.
- Maier, F. et al., 2015. Robust phase unwrapping for MR temperature imaging using a magnitude-sorted list, multi-clustering algorithm. *Magnetic Resonance in Medicine*, 73(4), pp.1662–1668.
- Martin, E. et al., 2009. High-intensity focused ultrasound for noninvasive functional neurosurgery. *Annals of Neurology*.
- Marty, B., 2012. *Développements de stratégies de quantification et de dispositifs expérimentaux pour l'IRM moléculaire de biomarqueurs endovasculaires et intratissulaires de pathologies cérébrales*. Université Paris 11, France.
- Marty, B. et al., 2012. Dynamic study of blood-brain barrier closure after its disruption using ultrasound: a quantitative analysis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(10), pp.1948–1958.
- Marty, B. et al., 2013. Hindered diffusion of MRI contrast agents in rat brain extracellular micro-environment assessed by acquisition of dynamic T1 and T2 maps. *Contrast media & molecular imaging*, 8(1), pp.12–9.
- McDannold, N. et al., 2012. Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer research*, 72(14), pp.3652–63.
- McDannold, N. & Maier, S.E., 2008. Magnetic resonance acoustic radiation force imaging. *Medical Physics*, 35, pp.3748–3758.
- McDannold, N., Vykhodtseva, N. & Hynynen, K., 2008a. Blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound and circulating preformed microbubbles appears to be characterized by the mechanical index. *Ultrasound in medicine & biology*, 34(5), pp.834–840.
- McDannold, N., Vykhodtseva, N. & Hynynen, K., 2008b. Effects of acoustic parameters and ultrasound contrast agent dose on focused-ultrasound induced blood-brain barrier disruption. *Ultrasound in medicine & biology*, 34(6), pp.930–937.
- McDannold, N., Vykhodtseva, N. & Hynynen, K., 2006. Targeted disruption of the blood – brain barrier with focused ultrasound : association with cavitation. *Physics in medicine and biology*, 793.
- McDannold, N., Zhang, Y. & Vykhodtseva, N., 2011. Blood-brain barrier disruption and vascular damage induced by ultrasound bursts combined with microbubbles can be influenced by choice of anesthesia protocol. *Ultrasound in medicine & biology*, 37(8), pp.1259–1270.

Bibliographie

- McDannold, N.J. et al., 2005. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound in medicine & biology*, 31(11), pp.1527–1537.
- Moffett, J.R. et al., 2007. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Progress in neurobiology*, 81(2), pp.89–131.
- Muthupillai, R. et al., 1995. Magnetic resonance elastography by direct visualization of propagating acoustic strain waves. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5232), pp.1854–7.
- Nadal, A. et al., 1995. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), pp.1426–30.
- Neuwelt, E.A. et al., 1985. Osmotic blood-brain barrier modification: monoclonal antibody, albumin, and methotrexate delivery to cerebrospinal fluid and brain. *Neurosurgery*, 17(3), pp.419–23.
- Nicholson, C. & Phillips, J.M., 1981. Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *The Journal of physiology*, 321, pp.225–57.
- Nicholson, C., Phillips, J.M. & Gardner-Medwin, A.R., 1979. Diffusion from an iontophoretic point source in the brain: role of tortuosity and volume fraction. *Brain research*, 169(3), pp.580–4.
- Nicholson, C. & Tao, L., 1993. Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical imaging. *Biophysical journal*, 65(6), pp.2277–90.
- Nicholson, D.W. et al., 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535), pp.37–43.
- O'Reilly, M. a et al., 2010. The impact of standing wave effects on transcranial focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier in a rat model. *Physics in medicine and biology*, 55(18), pp.5251–67.
- Ohtsuki, S. & Terasaki, T., 2007. Contribution of Carrier-Mediated Transport Systems to the Blood–Brain Barrier as a Supporting and Protecting Interface for the Brain; Importance for CNS Drug Discovery and Development. *Pharmaceutical Research*, 24(9), pp.1745–1758.
- OTSU, N., 1979. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1), pp.62–66.
- Pardridge, W.M., 2007. Blood–brain barrier delivery of protein and non-viral gene therapeutics with molecular Trojan horses. *Journal of Controlled Release*, 122(3), pp.345–348.
- Pardridge, W.M., 2012. Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(11), pp.1959–72.
- Pardridge, W.M., 2005. The Blood-Brain Barrier : Bottleneck in Brain Drug Development. , 2(January), pp.3–14.

- Patlak, C.S. & Fenstermacher, J.D., 1975. Measurements of dog blood-brain transfer constants by ventriculocisternal perfusion. *The American journal of physiology*, 229(4), pp.877–84.
- Pernot, M. et al., 2003. High power transcranial beam steering for ultrasonic brain therapy. *Physics in medicine and biology*, 48(16), pp.2577–89.
- Peters, R.D., Hinks, R.S. & Henkelman, R.M., 1998. Ex vivo tissue-type independence in proton-resonance frequency shift MR thermometry. *Magnetic resonance in medicine*, 40(3), pp.454–9.
- De Poorter, J. et al., 1995. Noninvasive MRI thermometry with the proton resonance frequency (PRF) method: in vivo results in human muscle. *Magnetic resonance in medicine*, 33(1), pp.74–81.
- Pulkkinen, A. et al., 2014. Numerical simulations of clinical focused ultrasound functional neurosurgery. *Physics in medicine and biology*, 59(7), pp.1679–700.
- Quesson, B., de Zwart, J.A. & Moonen, C.T., 2000. Magnetic resonance temperature imaging for guidance of thermotherapy. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*, 12(4), pp.525–33.
- Rall, D.P., Oppelt, W.W. & Patlak, C.S., 1962. Extracellular space of brain as determined by diffusion of inulin from the ventricular system. *Life Sciences*, 1(2), pp.43–48.
- Raymond, S.B. et al., 2007. Multiphoton imaging of ultrasound/Optison mediated cerebrovascular effects in vivo. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(2), pp.393–403.
- Rieke, V. & Pauly, K.B., 2009. MR Thermometry. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*, 27(2), pp.376–390.
- Risau, W. & Wolburg, H., 1990. Development of the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 13(5), pp.174–178.
- Roberts, W.W., 2014. Development and translation of histotripsy: current status and future directions. *Current opinion in urology*, 24(1), pp.104–10.
- Rooney, W.D. et al., 2007. Magnetic field and tissue dependencies of human brain longitudinal $^1\text{H}_2\text{O}$ relaxation in vivo. *Magnetic Resonance in Medicine*, 57(2), pp.308–318.
- Samiotaki, G. et al., 2012. A quantitative pressure and microbubble-size dependence study of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening reversibility in vivo using MRI. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 67(3), pp.769–77.
- Sarvazyan, A.P. et al., 1998. Shear wave elasticity imaging : a new ultrasonic technology of medical diagnostics. *Ultrasound in medicine & biology*, 24(9), pp.1419–1435.
- Schlageter, K.E. et al., 1999. Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvascular research*, 58(3), pp.312–28.
- Schnyder, A. & Huwyler, J., 2005. Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(1), pp.99–107.

Bibliographie

- Sheikov, N. et al., 2006. Brain arterioles show more active vesicular transport of blood-borne tracer molecules than capillaries and venules after focused ultrasound-evoked opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound in medicine & biology*, 32(9), pp.1399–409.
- Sheikov, N. a et al., 2004. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound in medicine & biology*, 30(7), pp.979–989.
- Sheikov, N. a et al., 2008. Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound in medicine & biology*, 34(7), pp.1093–1104.
- Sofroniew, M. V & Vinters, H. V, 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), pp.7–35.
- Solomon, I., 1955. Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Physical Review*, 99(2), pp.559–565.
- Swift, T.J. & Connick, R.E., 1962. NMR-Relaxation Mechanisms of O17 in Aqueous Solutions of Paramagnetic Cations and the Lifetime of Water Molecules in the First Coordination Sphere. *The Journal of Chemical Physics*, 37(2), p.307.
- Sykova, E., 2014. Astrocytes and extracellular matrix in extrasynaptic volume transmission.
- Syková, E., 2004. Diffusion properties of the brain in health and disease. *Neurochemistry international*, 45(4), pp.453–66.
- Syková, E. & Nicholson, C., 2008. Diffusion in brain extracellular space. *Physiological reviews*, 88(4), pp.1277–340.
- Thorne, R.G., Hrabetová, S. & Nicholson, C., 2004. Diffusion of epidermal growth factor in rat brain extracellular space measured by integrative optical imaging. *Journal of neurophysiology*, 92(6), pp.3471–81.
- Thorne, R.G. & Nicholson, C., 2006. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), pp.5567–72.
- Tkac, I. et al., 1999. In vivo ¹H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magnetic Resonance in Medicine*, 41(4), pp.649–656.
- Torr, G.R., 1984. The acoustic radiation force. *American Journal of Physics*, 52(5), p.402.
- Treat, L.H. et al., 2007. Targeted delivery of doxorubicin to the rat brain at therapeutic levels using MRI-guided focused ultrasound. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121(4), pp.901–7.
- Tucker, I.G., Yang, L. & Mujoo, H., 2012. Delivery of drugs to the brain via the blood brain barrier using colloidal carriers. *Journal of microencapsulation*, 29(5), pp.475–86.
- Tufail, Y. et al., 2010. Transcranial Pulsed Ultrasound Stimulates Intact Brain Circuits. *Neuron*, 66, pp.681–694.

- Tung, Y.-S. et al., 2010. In vivo transcranial cavitation threshold detection during ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice. *Physics in medicine and biology*, 55(20), pp.6141–55.
- Tyler, W.J. et al., 2008. Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound. *PloS one*, 3(10), p.e3511.
- Uchida, T. et al., 2009. Transrectal high-intensity focused ultrasound for the treatment of localized prostate cancer: eight-year experience. *Internal Journal of Urology*, 16(11), pp.881–886.
- Verploegh, I.S.C. et al., 2015. Contemporary frameless intracranial biopsy techniques: Might variation in safety and efficacy be expected? *Acta neurochirurgica*.
- Vold, R.L., 1968. Measurement of Spin Relaxation in Complex Systems. *The Journal of Chemical Physics*, 48(8), p.3831.
- Vykhodtseva, N. et al., 2000. MRI detection of the thermal effects of focused ultrasound on the brain. *Ultrasound in medicine & biology*, 26(5), pp.871–80.
- Vykhodtseva, N., McDannold, N. & Hynynen, K., 2008. Progress and problems in the application of focused ultrasound for blood-brain barrier disruption. *Ultrasonics*, 48(4), pp.279–96.
- Wolburg, H. et al., 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell and tissue research*, 335(1), pp.75–96.
- Wolburg, H. & Lippoldt, A., 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular pharmacology*, 38(6), pp.323–37.
- Wu, F. et al., 2004. Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of 1038 patients with solid carcinomas in China: an overview. *Ultrasonics sonochemistry*, 11(3-4), pp.149–154.
- Yan, Q. et al., 1994. Distribution of intracerebral ventricularly administered neurotrophins in rat brain and its correlation with trk receptor expression. *Experimental neurology*, 127(1), pp.23–36.
- Yang, F.-Y. et al., 2007. Quantitative evaluation of the use of microbubbles with transcranial focused ultrasound on blood-brain-barrier disruption. *Ultrasonics sonochemistry*, 15(4), pp.636–43.
- Yang, F.-Y. et al., 2011. Reversible blood-brain barrier disruption by repeated transcranial focused ultrasound allows enhanced extravasation. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 150(1), pp.111–6.
- Yemisci, M. et al., 2015. Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(3), pp.469–75.
- Yoo, S.-S. et al., 2011. Focused ultrasound modulates region-specific brain activity. *NeuroImage*, 56(3), pp.1267–1275.
- Younan, Y. et al., 2013. Influence of the pressure field distribution in transcranial ultrasonic neurostimulation. *Medical physics*, 40(8), p.082902.

Bibliographie

- Zaccaria, A. et al., 2015. Accessing to the minor proteome of red blood cells through the influence of the nanoparticle surface properties on the corona composition. *International journal of nanomedicine*, 10, pp.1869–83.
- Zhang, E.Y. et al., 2002. Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates. *Drug metabolism reviews*, 34(4), pp.709–50.
- Zhao, M. et al., 2011. Quality-guided phase unwrapping technique: comparison of quality maps and guiding strategies. *Applied optics*, 50(33), pp.6214–24.

Annexe A : Algorithme d'Otsu

Considérons une image de N pixels dont les valeurs sont réparties sur L niveau de gris, chaque niveau i ($i \in [0, L]$) étant peuplé de n_i pixels. On peut alors calculer la fréquence p_i de chaque niveau de gris selon :

$$p_i = \frac{n_i}{N}, \quad p_i \geq 0, \quad \sum_{i=0}^L p_i = 1$$

Considérons maintenant deux classes C_0 et C_1 dont le seuil de séparation est le niveau de gris k (un pixel p de valeur de niveau de gris i appartient à C_0 si i appartient à $[0, k]$ et appartient à C_1 si i appartient à $[k+1, L]$). Introduisons les probabilités $\omega_{i,(i=0,1)}$ de chacune de ces classes définies de la façon suivante :

$$\omega_0(k) = \sum_{i=0}^k p_i = \omega(k) \text{ et } \omega_1(k) = \sum_{i=k+1}^L p_i = 1 - \omega(k)$$

Les moyennes $\mu_{i,(i=0,1)}$ de chacune des classes sont données par :

$$\mu_0(k) = \frac{1}{\omega_0} \sum_{i=0}^k ip_i = \frac{\mu(k)}{\omega(k)} \text{ et } \mu_1(k) = \frac{1}{\omega_1} \sum_{i=k+1}^L ip_i = \frac{\mu_T - \mu(k)}{1 - \omega(k)}$$

En notant :

$$\mu(k) = \sum_{i=0}^k ip_i \text{ et } \mu_T = \sum_{i=0}^L ip_i,$$

Selon la méthode d'Otsu, le seuil optimal t est trouvé en minimisant la variance intraclasse. Or on peut montrer que ceci revient à maximiser la variance interclasses σ_B donnée par :

$$\sigma_B(k) = \omega_0(k)\omega_1(k)(\mu_0(k) - \mu_1(k))^2 = \frac{(\omega(k)\mu_T - \mu(k))^2}{\omega(k)(1 - \omega(k))}$$

Cette dernière formule permet d'établir un algorithme de détermination du seuil relativement efficace et aisé à mettre en œuvre puisqu'il ne nécessite pas le calcul des variances, et qu'il peut être implémenté de façon itérative. Cet algorithme suit le schéma suivant :

- Une première étape consiste à calculer les p_i pour chaque niveau de gris, μ_T ainsi que les valeurs initiales $\omega(0) = p_0$ et $\mu(0)$.
- On calcule ensuite $\sigma_B(k)$ pour chacune des valeurs de k . Cette étape se réalise assez simplement de façon itérative, puisque pour chaque k supérieur à 1, les valeurs de $\omega(k)$ et de $\mu(k)$ sont données par :

$$\omega(k) = \omega(k-1) + p_k \text{ et } \mu(k) = \mu(k-1) + k * p_k$$

Enfin on détermine la valeur de k pour laquelle $\sigma_B(k)$ est maximum, ce qui donne la valeur du seuil.

Annexe B : Protocole utilisé pour l'histologie

Extraction et préparation des cerveaux

Les animaux sont sacrifiés par perfusion intra-cardiaque de sérum physiologique (0.9 % NaCl) puis de paraformaldéhyde (PFA) 4%. Cette étape permet à la fois d'éliminer les composants vasculaires, et d'accélérer la fixation des tissus en distribuant rapidement l'agent fixateur dans tout l'organisme via le système circulatoire. Les cerveaux sont ensuite extraits, puis les tissus sont fixés par un bain dans une solution de PFA 4% durant 2h. Ils sont ensuite trempés durant 24 à 48 heures dans une solution de sucrose 15%, puis de 48 à 72 heures dans une solution de sucrose 30%, cette étape ayant pour but de protéger les tissus lors de la congélation. Ils sont ensuite congelés à -30°C dans de l'isopentane, puis conservés à -80°C.

Protocole général de marquage

Des coupes de 20 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat. Le protocole général utilisé pour marquer ces coupes est le suivant :

- Les coupes sont réhydratées dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) 2 fois 5 minutes.
- Un blocage des sites non spécifiques est ensuite effectué durant 30 min dans une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) 4% en sérum de chèvre ou d'âne 5%. Les coupes sont rincées à l'issue du blocage.
- Les coupes sont incubées dans le bain d'anticorps primaire durant une heure à température ambiante.
- Elles sont ensuite lavées dans une solution de PBS par deux bains consécutifs de 5 minutes.
- Pour les anticorps primaires non conjugués à un fluorochrome, un bain d'une heure à température ambiante avec un anticorps secondaire est réalisé pour révéler le couplage de l'anticorps primaire sur sa cible.
- Les coupes sont ensuite rincées par trois bains successifs de 5 minutes dans une solution de PBS.

Certains marquages nécessitent une perméabilisation des tissus afin d'atteindre leur cible. Dans ce cas, la perméabilisation est réalisée durant l'étape de blocage par l'ajout de triton 0.2 à 1.5% au bain, qui est alors prolongé durant 2 heures.

Marquages utilisés

- Anti-NeuN : anticorps primaire de souris, conjugué avec le fluorophore Alexa488 (Millipore, Etats-Unis, réf : Mab377X). Dilution 1/100 de la solution commerciale.
- Anti-GFAP : anticorps primaire de lapin (Abcam, Royaume-Uni, réf : ab7260). Dilution 1/500 de la solution commerciale. Nécessite une perméabilisation (triton 0.75% dans la solution de blocage). Révélé par un anticorps secondaire de chèvre ou d'âne anti-lapin.

- Anti-Iba1 : anticorps primaire de chèvre (Abcam, réf : ab5076). Dilution 1/500 de la solution commerciale. Nécessite une perméabilisation (triton 0.2% dans la solution de blocage). Révélé par un anticorps secondaire d'âne anti-chèvre.
- Anti-Caspase3 : anticorps primaire de lapin (Abcam, ab13847). Dilution 1/1250 de la solution commerciale. Nécessite une perméabilisation (triton 0.2% dans la solution de blocage). Révélé par un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin.

Communications scientifiques

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

1. Magnetic resonance- guided motorized transcranial ultrasound system for blood-brain barrier permeabilization along arbitrary trajectories in rodents. Magnin R, Rabusseau F, Salabartan F, Mériaux S, Aubry J-F, Le Bihan D, Erik Dumont E, Larrat B. Journal of Therapeutic Ultrasound, 2015.
2. Gadolinium-based nanoparticles diffusion within the brain tissue following ultrasound induced Blood Brain Barrier permeabilization. Magnin R*, Conti A*, Gerstenmayer M, Della Penna S, Romani G L, Dumont E, Mériaux S, Le Bihan D, Larrat B. En cours d'écriture. *Contribution égale.
3. Magnetic Resonance acoustic radiation force Imaging for in vivo mapping of ultrasonic transmission factor through rat skulls. Gerstenmayer M, Magnin R, Fellah B, Dumont E, Le Bihan D, Larrat B. En preparation.

Communications en conférences internationales

Communications orales

1. A new motorized MR-guided ultrasound system for the delivery of large molecules to the rodent brain. Magnin R*, Mériaux S, Le Bihan D, Dumont E, Larrat B. ISTU 2014. Las Vegas.
2. Ultrasound induced Blood Brain Barrier permeability: a safety study in rats. Magnin R*, Geffroy F, Mériaux S, Le Bihan D, Larrat B. ISTU 2015. Utrecht.
3. MRI guided ultrasound induced blood-brain barrier disruption for the delivery of large molecules to the rodent brain. Larrat B*, Magnin R, Conti A, Marty B, Geffroy F, Gerstenmayer M, Dumont E, Le Bihan D, Mériaux S. Cerebro-Vascular Biology international meeting 2015. Paris.
4. Gadolinium-based nanoparticles diffusion within the brain tissue following ultrasound induced Blood Brain Barrier permeabilization. Magnin R, Conti A, Gerstenmayer M*, Lux F, Tillement O, Della Penna S, Romani G L, Dumont E, Mériaux S, Le Bihan D, Larrat B. European Nanomedicine Meeting 2015. Grenoble.
5. Gadolinium-based nanoparticles diffusion within the brain tissue following ultrasound induced blood-brain barrier permeabilisation. Gerstenmayer M*, Magnin R, Conti A, Valette J, Lux F, Tillement O, Mériaux S, Della Penna S, Luca Romani G, Dumont E, Le Bihan D, Larrat B. SEISC 2015.
6. Magnetic resonance acoustic radiation force imaging for in vivo estimation of ultrasonic transmission factor through rat skulls. Gerstenmayer M*, Magnin R, Fellah B, Le Bihan D, Larrat B. ISTU 2016. Tel-Aviv.
7. Relationship between acoustic pressure used for bbb disruption and amount of MRI contrast agent delivered to the brain. Gerstenmayer M*, Magnin R, Mériaux S, Le Bihan D, Larrat B. ISTU 2016. Tel-Aviv.
8. Characterization of the diffusion properties of different Gadolinium-based MRI contrast agents after the ultrasound induced Blood-Brain Barrier permeabilization. Conti A*, Magnin R, Gerstenmayer M, Lux F, Tillement O, Mériaux S, Della Penna S, Romani GL, Dumont E, Le Bihan D, Larrat B. ISTU 2016. Tel-Aviv.

Poster

1. A new motorized MR-guided ultrasound system for the controlled delivery of large molecules to the rodent brain. Magnin R*, Mériaux S, Le Bihan D, Dumont E, Larrat B. WMIC 2013. Savannah.
2. MR-guided ultrasound induced blood-brain barrier disruption for the delivery of large molecules to the rodent brain. Larrat B*, Magnin R, Marty B, Geffroy F, Le Bihan D, Mériaux S. AAPS 2014. San Diego.

Communications en conférences nationales

Communications orales

1. Mesures des propriétés contrastantes des nanohybrides AguiX sous IRM 7T pour étudier leur biodistribution cérébrale suite à leur délivrance localisée par ultrasons. Larrat B*, Magnin R, Conti A, Gerstenmayer M, Geffroy F, Marty B, Le Bihan D, Lux F, Tillement O, Mériaux S. Colloque Nanohybrides 2015. Bastia.
2. Développement et validation d'un système ultrasonore motorisé sous IRM haut champ pour la délivrance de médicaments dans le cerveau de rongeurs. Magnin R*, Marty B, Geffroy F, Aubry J-F, Le Bihan D, Mériaux S, Dumont E, Larrat B. Congrès de la SFRMBM 2015. Grenoble.
3. Development and validation of a motorized focused ultrasound system for the controlled delivery of large molecules to the rodent brain under 7T MRI guidance. Magnin R*, Mériaux S, Le Bihan D, Dumont E, Larrat B. Colloque RITS 2015. Dourdan.
4. Les ultrasons transcrâniens pour la perméabilisation locale et temporaire de la barrière hémato-encéphalique et l'accès thérapeutique au cerveau. Larrat B*, Magnin R, Conti A, Geffroy F, Gerstenmayer M, Le Bihan D, Marty B, Mériaux S. Journée de la FR Tecsant 2015. Pessac.

Poster

1. A new motorized MR-guided ultrasound system for the controlled delivery of large molecules to the rodent brain. Magnin R*, Mériaux S, Le Bihan D, Dumont E, Larrat B. Ecole d'hiver « Therapeutic Ultrasound » 2013. Les Houches.
2. MRI guided ultrasound induced blood-brain barrier disruption for the safe and efficient drug delivery to the brain. Magnin R*, Mériaux S, Le Bihan D, Dumont E, Larrat B. Workshop News 2014. Gif sur Yvette.
3. 3BOPUS project: Ultrasound aided drug delivery device as an innovative preclinical tool to accelerate drug discovery for brain diseases. Magnin R, Marty B, Mériaux S, Le Bihan D, Dumont E, Larrat B*. Journée RATS 2014. Fontenay aux Roses.

Titre : Développements précliniques de nouveaux outils utilisant les ultrasons transcrâniens guidés par IRM haut champ pour la délivrance de médicaments dans le cerveau et la stimulation non invasive de circuits neuronaux

Mots clés : Barrière Hémato-Encéphalique, Ultrasons, IRM haut champ, imagerie quantitative

Résumé : La Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) représente aujourd'hui un obstacle majeur pour le développement de nouveaux traitements des pathologies cérébrales puisqu'elle empêche le passage de la majorité des agents thérapeutiques vers le cerveau. Afin de contourner cet obstacle, une technique proposée dans les années 2000 a montré son potentiel pour perméabiliser la BHE de façon non-invasive, locale et transitoire grâce à l'utilisation conjointe de microbulles circulantes et d'ultrasons focalisés, permettant une augmentation significative de la quantité de molécules délivrée aux tissus cérébraux. Ce protocole peut néanmoins présenter des risques (œdèmes, micro-hémorragies) qu'il est possible de maîtriser grâce à un bon contrôle du faisceau acoustique. A ce titre, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) représente un outil de choix permettant à la fois de planifier la procédure, puis de la suivre et enfin d'étudier ses effets grâce à l'utilisation d'agents de contraste et de séquences d'imagerie quantitative (relaxométrie T1 / T2). Durant cette thèse, nous avons développé de nouveaux outils permettant l'étude de la perméabilisation de la BHE chez le rongeur. Dans un premier temps, nous avons développé et validé un système motorisé compatible IRM, permettant de déplacer le transducteur ultrasonore à l'intérieur d'un scanner préclinique à 7T, avec un rétro-contrôle en temps réel du faisceau ultrasonore sur la base des images IRM de la force de radiation acoustique (MR-ARFI). Nous avons montré que ce dispositif permettait de réaliser l'ensemble du protocole de perméabilisation de BHE guidé par IRM en choisissant la structure anatomique à traiter de façon reproductible. Nous avons également montré qu'il pouvait être utilisé pour délivrer des molécules sur des régions étendues du cerveau selon des trajectoires arbitrairement programmées. Dans une seconde partie de cette thèse, nous avons réalisé plusieurs études en vue d'étudier l'innocuité de la technique. Nous avons mis en évidence l'influence de certains paramètres acoustiques sur l'efficacité du protocole (pression acoustique, temps de cycle), puis nous avons réalisé une étude histologique des dommages engendrés par une perméabilisation chez des animaux sains pour plusieurs pressions acoustiques, entre 0 et 14 jours post-ultrasons. Enfin, dans une troisième partie, nous avons étudié la diffusion de différents agents de contraste paramagnétiques dans les tissus cérébraux suivant une perméabilisation focale de la BHE. Nous avons montré que cette technique permettait d'obtenir des mesures précises de la tortuosité des tissus cérébraux de façon non-invasive et que cette tortuosité n'était pas modifiée par les ultrasons, contrairement à ce qui est observé suite à une injection intracérébrale.

Title : Preclinical development of new tools using transcranial ultrasound under MRI-guidance for drug delivery to the rodent brain and non-invasive stimulation of neuronal circuits

Keywords : Blood-Brain Barrier, Ultrasound, high-field MRI, quantitative imaging

Abstract : By preventing most of the molecules from penetrating the brain in sufficient quantity, the Blood Brain Barrier represents a major obstacle for the development of new therapeutic drugs for brain diseases. A new technique introduced in the early 2000's combining focused ultrasound and circulating microbubbles has however shown promising results, allowing to induce a local and transient permeabilization of the BBB in a non-invasive manner, thus significantly improving the amount of drugs delivered to the Central Nervous System (CNS). However, this protocol may present some risks (oedema, small hemorrhages) which can be avoided by a good control of the acoustic beam properties. To do so, Magnetic Resonance Imaging (MRI) represents a very useful tool since it allows planning, monitoring and following the permeabilization effects by using MRI contrast agents and quantitative imaging sequences (T₁/T₂ relaxometry). During this PhD, we worked on developing new tools for the study of ultrasound induced BBB permeabilization in rodents. The first part of this work consisted in developing a MR compatible motorized device, allowing the displacement of the ultrasound transducer within a 7T preclinic MRI scanner, with a realtime feedback on the acoustic beam position thanks to MR Acoustic Radiation Force Imaging (MR-ARFI). We have shown that this system allowed performing a full BBB permeabilization protocol under MR-guidance, with an accurate and reproducible choice of the targeted anatomical structure. This system was also used to deliver drugs along arbitrary trajectories over extended regions of the brain. Another part of the work was dedicated to study and improve the safety of the procedure. The influence of different acoustic parameters (acoustic pressure, duty cycle) on the permeabilization efficacy was studied, as well as histologic investigations of short and mid-term effects of BBB permeabilization for different acoustic pressures on healthy rats. Finally, we investigated the diffusion process of contrast agents within the brain tissues following BBB permeabilization. We have shown that this technique allowed accurate measurements of brain tissues tortuosity in a non-invasive way, and found that the tortuosity was not modified by the ultrasound application.

